

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Mgr. Marie Tomanová

STANOVENÍ PROKAINU TECHNIKOU PRŮTOKOVÉ
INJEKČNÍ A SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY SE
SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKCÍ

Determination of Procaine by Flow Injection and Sequential
Injection Analysis with Spectrophotometric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2015.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Jakubu Hraníčkovi, Ph.D. za velkou pomoc při psaní této práce, za cenné rady, trpělivost a věnovaný čas.

Také bych chtěla poděkovat svým rodičům a prarodičům za psychickou a finanční podporu ve studiu.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením prokainu pomocí průtokové injekční a sekvenční injekční analýzy ve spojení se spektrofotometrickou detekcí. Stanovení je založeno na reakci prokainu s vybarvovacím činidlem, kterým je kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, kdy vzniká oranžový produkt, který je spektrofotometricky detekovatelný při vlnové délce 484 nm. Výška absorpčního signálu produktu této reakce je přímo úměrná koncentraci stanovovaného prokainu.

Cílem práce bylo optimalizovat parametry obou výše uvedených metod tak, aby meze detekce stanovení prokainu byly co nejnižší a zároveň aby bylo dosaženo vysoké citlivosti stanovení u obou metod. Následně byly tyto metody aplikovány na stanovení prokainu v reálných vzorcích.

Pro metodu průtokové injekční analýzy byl zjištěn lineární dynamický rozsah 2,5–120 µg/ml. Rovnice lineární regrese kalibrační závislosti byla $y = 0,0059x - 0,0051$, s korelačním koeficientem 0,9993. Zjištěná mez detekce prokainu činila 0,72 µg/ml. Optimalizována byla doba zastavení toku, průtoková rychlost reakčních složek, koncentrace vybarvovacího činidla, pH prostředí a objem dávkovací smyčky.

Pro metodu sekvenční injekční analýzy byl zjištěn lineární dynamický rozsah 2,5–120 µg/ml. Rovnice lineární regrese kalibrační závislosti byla $y = 0,0041x - 0,0073$, s korelačním koeficientem 0,9990. Byla nalezena mez detekce prokainu 0,68 µg/ml. Optimalizována byla koncentrace vybarvovacího činidla, objemy reakčních zón, průtoková rychlost reakčních složek a časová závislost vzniku produktu.

Obě metody byly za optimálních podmínek úspěšně aplikovány na stanovení prokainu v injekčním roztoku prokain hydrochloridu o koncentracích 0,2 % a 0,5 %.

Klíčová slova

prokain hydrochlorid, kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, spektrofotometrie, průtoková injekční analýza, sekvenční injekční analýza, farmaceutické vzorky

Abstract

This diploma thesis is focused to the determination of procaine using flow injection and sequential injection analysis coupled with spectrophotometric detection. This determination is based on the reaction of procaine with a colouring agent, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid. An orange coloured product is formed, which is determined spectrophotometrically at the wavelength 484 nm. The high of the absorption signal of the product is directly proportional to the concentration of procaine.

The aim of this work was to optimize the parameters of both methods of flow analysis so that the limit concentration of procaine can be as low as possible and at the same time, high sensibility is achieved. The next step was to apply these methods on the determination of procaine in real samples.

It was found that in flow injection analysis, the absorbance of procaine hydrochloride obeys Beer's law for concentrations from 2.5 to 120 µg/ml. The linear regression equation of calibration graph was $y = 0.0059x - 0.0051$, with a linear regression correlation coefficient 0.9993. Limit of detection was 0.72 µg/ml. Effects of standing time (stopped-flow), flow rate, concentration of colouring agent, pH and the volume of the sample loop have been examined and optimized.

It was also found that in sequential injection analysis, the absorbance of procaine hydrochloride obeys Beer's law for concentrations from 2.5 to 120 µg/ml. The linear regression equation of calibration graph was $y = 0.0041x - 0.0073$, with a linear regression correlation coefficient 0.9990. Limit of detection was 0.68 µg/ml. Effects of concentration of colouring agent, volume of reaction zones, flow rate and time dependence of formation of the product have been examined and optimized.

Both methods under the optimal conditions have been successfully applied to the determination of procaine in the injection solution of procaine hydrochloride of concentrations of 0.2% and 0.5%.

Keywords

procaine hydrochloride, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid, spectrophotometry, flow injection analysis, sequential injection analysis, pharmaceuticals

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	8
1 Úvod.....	10
2 Teoretická část	11
2.1 Průtokové metody	11
2.1.1 Segmentová průtoková analýza, SFA	11
2.1.2 Průtoková injekční analýza, FIA	12
2.1.3 Sekvenční injekční analýza, SIA	15
2.2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV a Vis oblasti.....	19
2.3 Prokain	21
2.3.1 Prokain – látka a její vlastnosti	21
2.3.2 Stanovení prokainu	24
3 Experimentální část.....	29
3.1 Používané přístroje, zařízení a programy	29
3.2 Použité chemikálie, příprava roztoků	30
3.3 Vybarvovací reakce	31
3.4 Uspořádání měření a experimentální aparatura	32
3.4.1 Statické uspořádání	32
3.4.2 Měření pomocí hmotnostního spektrometru.....	32
3.4.3 Průtokové injekční uspořádání.....	32
3.4.4 Sekvenční injekční uspořádání	34
3.5 Statistické zpracování dat	36
4 Výsledky a diskuze	39
4.1 Statické uspořádání	39
4.1.1 Proměření absorpčních spekter	39
4.1.2 Rychlost vzniku Produktu.....	41
4.1.3 Vliv přídavku organického rozpouštědla	42
4.1.4 Vliv koncentrace vybarvovacího činidla	43
4.1.5 Vliv přídavku surfaktantu	44
4.1.6 Vliv teploty	45
4.2 Měření pomocí hmotnostního spektrometru.....	46

4.3 Průtokové injekční uspořádání.....	48
4.3.1 Optimalizace doby zastavení toku	50
4.3.2 Optimalizace průtokové rychlosti	51
4.3.3 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla	52
4.3.4 Optimalizace objemu dávkovací smyčky	53
4.3.5 Vliv pH	54
4.3.6 Shrnutí optimálních podmínek.....	54
4.3.7 Kalibrační závislost v uspořádání FIA.....	54
4.3.8 Charakteristiky FIA stanovení	56
4.3.9 Stanovení prokainu ve farmaceutických vzorcích pomocí FIA.....	57
4.4 Sekvenční injekční uspořádání	58
4.4.1 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla	59
4.4.2 Optimalizace objemů reakčních zón.....	60
4.4.3 Optimalizace průtokové rychlosti	62
4.4.4 Optimalizace časové závislosti vzniku Produktu.....	63
4.4.5 Shrnutí optimálních podmínek.....	64
4.4.6 Kalibrační závislost v uspořádání SIA.....	65
4.4.7 Charakteristiky SIA stanovení	66
4.4.8 Stanovení prokainu ve farmaceutických vzorcích pomocí SIA.....	67
4.5 Porovnání FIA a SIA uspořádání.....	68
5 Závěr	70
Literatura.....	72

Seznam zkratek a symbolů

A	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
c_e	koncentrace ethanolu [obj. %]
c_k	koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové [$\mu\text{g/ml}$]
c_p	koncentrace prokainu [$\mu\text{g/ml}$]
c_s	koncentrace sodium dodecyl sulfátu [$\mu\text{g/ml}$]
CV	cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry)
DPV	diferenční pulsní voltametrie (Differential Pulse Voltammetry)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
F_{OUT}	průtoková rychlost s jakou je produkt transportován do cely [ml/min]
F_{IN}	průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky [ml/min]
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
ICP	indukčně vázaná plazma (Inductively Coupled Plasma)
k	tabelovaný koeficient pro výpočet směrodatné odchylky
L	délka absorbujícího prostředí [cm]
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LC	kapalinová chromatografie (Liquid chromatography)
LOD	mez detekce (Limit of Detection) [$\mu\text{g/ml}$]
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification) [$\mu\text{g/ml}$]
LOV	vícecestný ventil jehož součástí je průtoková cela (Lab-on-Valve)
M	molární hmotnost [g/mol]
m/z	poměr hmotnosti a náboje
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	počet měření
R	rozpětí
R^2	korelační koeficient
RRS	Resonanční Rayleighův Rozptyl
s	směrodatná odchylka
SDS	sodium dodecyl sulfát

SFA	segmentovaná průtoková analýza (Segmented flow analysis)
s_r	relativní směrodatná odchylka [%]
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis)
SIA-LOV	miniaturizovaná sekvenční injekční analýza s ventilem Lab-on-Valve
SWV	squarewave voltametrie (Squarewave Voltammetry)
t	čas [min, s]
T	transmittance
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření
V_{DS}	objem dávkovací smyčky [μ l]
V_K	objem kyseliny 1,2-nafotochinon-4-sulfonové [μ l]
V_P	objem prokainu [μ l]
V_{RC}	objem reakční cívky [μ l]
\bar{x}	aritmetický průměr
\tilde{x}	medián
ε	molární absorpční koeficient [$l/(cm \cdot mol)$]
λ	vlnová délka [nm]
Φ, Φ_0	procházející a dopadající světelný tok

1 Úvod

Prokain je látka, která se používá jako anestetikum v dentální chirurgii. Stanovován byl již pomocí mnoha metod. Publikovaná stanovení prokainu spektrofotometricky pomocí SIA mají vyšší meze detekce, než stanovení prokainu spektrofotometricky ve statickém uspořádání [1, 2]. Proto byla vybrána vhodná spektrofotometrická metoda s nízkou mezí detekce, kdy cílem je uvést ji do dynamického uspořádání a zachovat přitom nízkou mez detekce.

Prvním úkolem bylo ověřit parametry metody stanovení prokainu uvedené v článku [1], ze kterého je v této práci vycházeno. Dalším úkolem bylo převést a optimalizovat dané stanovení provedené metodou průtokové injekční analýzy (FIA) a následně potom metodou sekvenční injekční analýzy (SIA). Nakonec bylo cílem změřit reálné vzorky prokainu (konkrétně v lékové formě injekčního roztoku) pomocí obou optimalizovaných metod ve spojení se spektrofotometrickou detekcí.

2 Teoretická část

2.1 Průtokové metody

Průtokové metody umožňují měření látek v proudu nosné kapaliny. Jsou univerzální díky možnosti spojení s různými detektory, jako například fotometrické, fluorimetrické, detektory využívající chemiluminiscenci, detektory refraktometrické, AAS, ICP, plamenová fotometrie, iontově selektivní elektrody a vodivostní nebo coulometrické detektory [3].

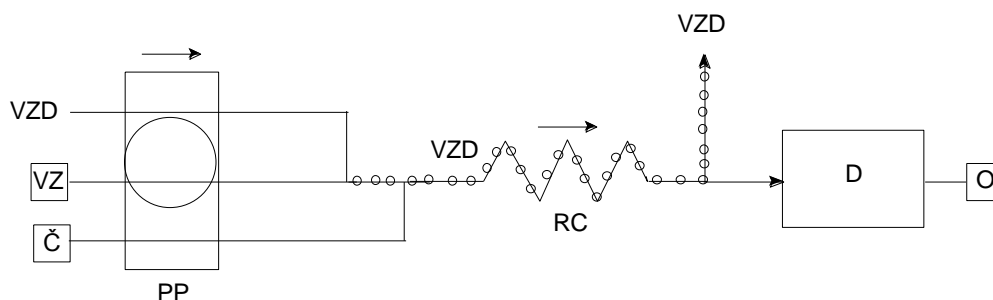
Průtokové metody umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků, a tak zvyšují produktivitu běžných stanovení [4]. Výhodou těchto technik je také nízká spotřeba činidel a vzorků, s tím související i nízká produkce odpadu, což má význam jak pro ekonomické, tak i ekologické hledisko.

Průtokové metody jsou vhodné k monitorování mnoha různých environmentálních parametrů ve vzorcích vody, protože splňují požadavky na robustnost, rychlost a jsou schopné velkého množství analýz v krátkém čase. Zlepšující se počítačová vybavenost jednotlivých laboratoří se ve vývoji průtokových metod odrazila pokrokem od Segmentované průtokové analýzy (SFA), přes Průtokovou injekční analýzu (FIA) k Sekvenční injekční analýze (SIA) a k její nejnovější variantě mikro SIA-LOV [5].

2.1.1 Segmentová průtoková analýza, SFA

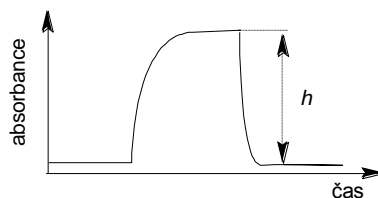
SFA (Segmented Flow Analysis) je jednou z prvních průtokových technik, která našla uplatnění v laboratořích požadujících velké objemy analýz (například nemocniční laboratoře). V segmentové průtokové analýze je vzorek rozdělen pomocí vzduchových bublinek na jednotlivé segmenty a přiveden peristaltickou pumpou do proudu nosného roztoku. V každém segmentu proběhnou všechny reakce potřebné pro vznik produktu. Systém je navržen tak, aby reakce v každém segmentu došla do rovnováhy, a teprve poté je produkt změřen v detektoru [3]. Bublínky jsou z nosného toku odstraněny před vstupem do detektoru. Schéma SFA je na Obr. 2.1, charakter odezvy z detektoru na Obr. 2.2. Uspořádání SFA je obvykle vícekanálové a každý kanál má pro každý stanovovaný parametr vlastní detektor (SFA je navrhovaná pro stanovení až dvaceti různých parametrů). A proto bývá SFA drahá. Další nevýhodou je poměrně dlouhá doba analýzy, 2–30 minut. Objemy nasátého vzorku se pohybují v rozmezí 0,2–2 ml, průměr trubiček 2 mm.

Frekvence vzorkování může být až 80 vzorků za hodinu. Spotřeba činidel a vzorků je velká, nutné jsou také promývací cykly [6].



Obr. 2.1 Schéma segmentové průtokové analýzy

VZD – vzduch, VZ – vzorek, Č – činidlo, PP – peristaltická pumpa, RC – reakční cívka, D – detektor, O – odpad



Obr. 2.2 Charakter odezvy při segmentové průtokové analýze

h – výška signálu

2.1.2 Průtoková injekční analýza, FIA

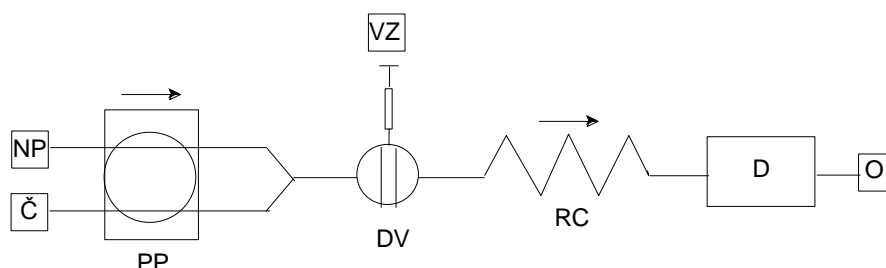
FIA (Flow Injection Analysis) byla poprvé popsána a patentována v Dánsku, v roce 1974, Jaromírem Růžičkou a Elo Haraldem Hansenem. Jedná se o analytickou metodu s kontinuálním tokem všech roztoků, kdy je do proudu reagentů dávkován reprodukovatelný objem vzorku [7]. Oproti SFA není tok segmentovaný bublinkami, dochází pouze k částečnému smíchání vzorku s činidly a do detektoru tak směs vstupuje ještě před dosažením rovnováhy [6, 3].

FIA je automatizovaná technika vhodná pro optimalizace a rutinní laboratorní analýzy.

Popis uspořádání systému

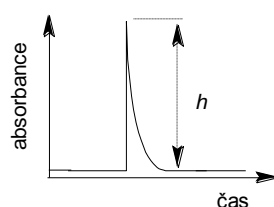
Typický FIA systém se skládá z peristaltické pumpy, která řídí nosný tok, dávkovače vzorků s dávkovací smyčkou umožňující injikovat vzorek přímo do nosného proudu,

reakční cívky a detektoru. Schematicky je FIA znázorněná na Obr. 2.3, charakter odezvy na obrázku 2.4. Dávkovač vzorků je v konvenčním FIA uspořádání ventil (většinou šesti nebo osmicestný) s dvěma polohami (load/insert). S dávkovačem je spojena dávkovací smyčka fixního objemu. Proto nemůže být objem vzorku jednoduše měněn pomocí počítače, vždy je třeba fyzické výměny smyčky [8]. Vlastní pohyb vzorku a činidel probíhá v teflonových nebo polyethylenových trubicích o vnitřním průměru 0,5–1 mm, díky čemuž se uplatňuje především laminární proudění toku. Objem nadávkovaného vzorku je u FIA mnohem menší než u SFA – jedná se o objemy 10–100 µl. Doba odezvy je 3–60 s, frekvence dávkování může být 120 vzorků za hodinu. Spotřeby činidel jsem mnohem menší než u SFA, u FIA je také realizovatelné měření kinetik [3].



Obr. 2.3 Schéma průtokové injekční analýzy

NP – nosný proud, Č – činidlo, PP – peristaltická pumpa, VZ – vzorek, DV – dávkovací ventil, RC – reakční cívka, D – detektor, O – odpad

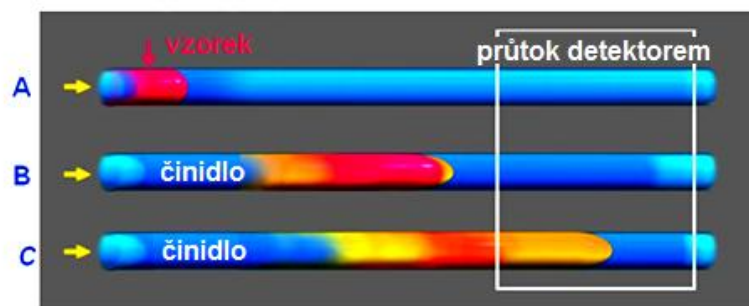


Obr. 2.4 Charakter odezvy při průtokové injekční analýze

h – výška signálu

Princip měření

Roztok vzorku je nadávkován do proudu nosného toku, který se pohybuje kontinuálně, s konstantní průtokovou rychlostí. Nosný tok transportuje analyzovaný vzorek přes reakční cívku do detektoru. Analýza se sestává z následujících kroků (Obr. 2.5) [7].



Obr. 2.5 Princip metody FIA (upraveno podle [7])

A – nadávkování vzorku (červená), B – vznik produktu (žlutá), C – detekce produktu detektorem

Přesný objem roztoku vzorku (červená) je nadávkován do proudu činidla (modrá). Zóna vzorku se pohybuje po proudu, je disperzí míchána s činidlem za vzniku produktu (žlutá), který pokračuje do detektoru a poskytuje analytický signál. Stanovení neznámých vzorků se provádí pomocí kalibrační křivky, výška píku odpovídá koncentraci. Aby byly výsledky reprodukovatelné, musí být celý proces přesně časován (zajišťuje peristaltická pumpa) [7].

Výška a tvar signálu závisí na délce reakčních cívek (s rostoucí délkou klesá výška píku a pík se rozšiřuje), objemu vzorku (s rostoucím objemem vzorku roste výška a šířka píku), na vnitřním průměru vedení, na lineární rychlosti proudění kapaliny (se zvyšující se rychlostí se zmenšuje disperze), vnitřním objemu detekční cely a geometrii systému.

Pro každou analýzu je třeba provádět optimalizaci. Aby bylo dosaženo kvalitního signálu, je třeba nechat reagovat směs dostatečně dlouhou dobu, nicméně se zvyšujícím se reakčním časem se zvyšuje také disperze zóny, a tak je třeba najít mezi těmito dvěma parametry kompromis.

Výhody a nevýhody

Hlavní výhodou FIA je velká reprodukovatelnost výsledků, nízké počáteční investice a snadná údržba. Metoda má ovšem i mnoho nevýhod. Jednou z nich je používání peristaltické pumpy, kvůli které časem dochází k deformaci flexibilních teflonových trubiček a je proto třeba celý systém překalibrovat. Trubičky jsou náchylné k poničení také při používání agresivních činidel, jako jsou koncentrované kyseliny/báze nebo různá organická rozpouštědla. V každém případě je FIA jednou z nejvíce preferovaných technik pro stanovení jednoho parametru v sadě velkého množství vzorků [3].

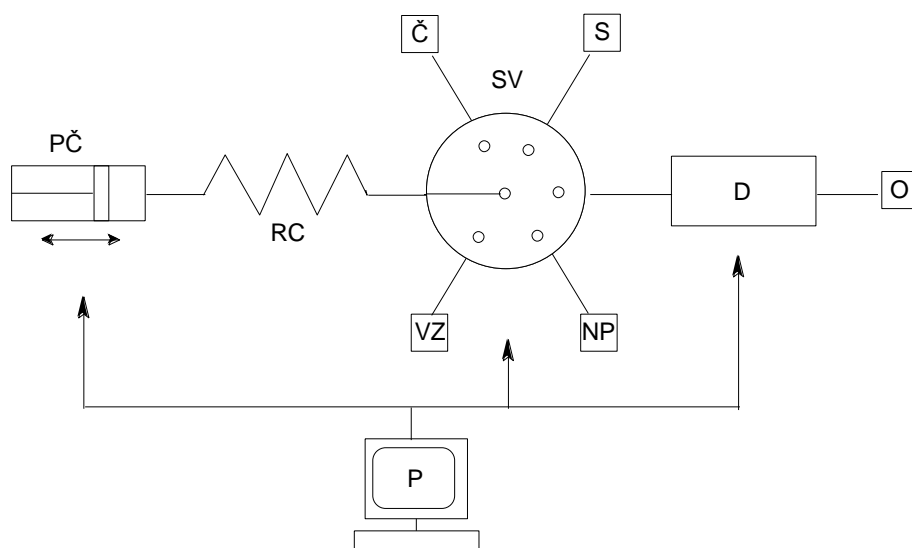
2.1.3 Sekvenční injekční analýza, SIA

Sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis) je druhou generací průtokové injekční analýzy. Byla představena v roce 1990 Jaromírem Růžičkou a Grahamem Deanem Marshallem jako nástroj procesu kontroly, ale plného využití dosáhla až o deset let později, kdy došlo k její miniaturizaci a kontrole počítačem [7]. SIA byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy [9].

Technika SIA pracuje na odlišném principu než FIA. Používá totiž oddělení měřicí cykly, kdy je do jednokanálového systému postupně pomocí pístového čerpadla nadávkována zóna nosného média, vzorku a činidla. Poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, vzorek se promíchá s činidlem a vzniklý produkt je dopraven do detektoru [4]. Toto je jeden měřicí cyklus, jedna sekvence (proto „sekvenční“ analýza). Dalším rozdílem oproti FIA je, že průtoková injekční analýza využívá přímý konstantní tok, kdežto SIA je založena na změnách přímého a zpětného toku. Z toho vyplývá i mnohem menší spotřeba chemikálií a produkce odpadu, než ve FIA. Významný rozdíl je také v tom, že SIA je řízena počítačem, respektive příslušným programem, který kontroluje kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

Popis uspořádání systému

Typický systém SIA se stává z dvojsměrného pístového čerpadla, reakční cívky (slouží i jako pojistka proti vniknutí vzorku nebo činidla do čerpadla), vícecestného ventilu (nejčastěji 6, 8 a 10-cestný), příslušného detektoru a spojovacích trubiček (teflonových nebo polyethylenových, o vnitřním průměru 0,7–0,8 mm). Schematické znázornění je na Obr. 2.6. Průtokové rychlosti jsou podobné jako u FIA, kolem 1 ml/min, doba trvání jednoho měřicího cyklu většinou nepřesahuje 30 s, což je také srovnatelné s frekvencí dávkování u FIA. Jelikož je systém řízený počítačem, je možné si pomocí softwaru navolit dávkovaný objem vzorku i činidel a není tak nutné fyzicky měnit dávkovací smyčku jako u FIA. Objemy roztoků jsou dány časově, délkou pohybu pístu čerpadla.



Obr. 2.6 Schéma sekvenční injekční analýzy [překresleno dle článku v češtině]

PČ – pístové čerpadlo, RC – reakční cívka, Č – činidlo, VZ – vzorek, SV – selekční ventil, S – standard, NP – nosný proud, D – detektor, O – odpad

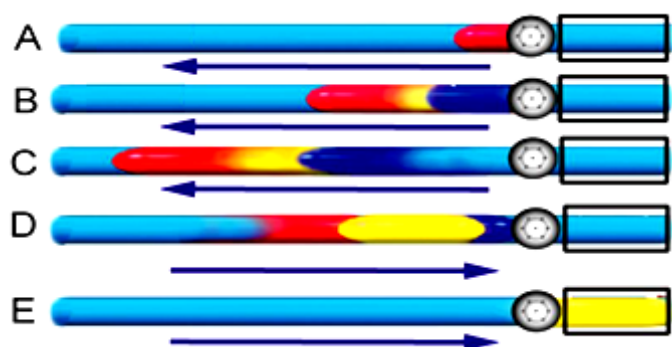
Princip měření [7]

Analýza se skládá z následujících kroků (Obr. 2.7).

Přesně daný objem analytu (červená) je nadávkován do reakční cívky, poté je aspirován zvolený objem činidla (tmavě modrá). Nadávkované zóny se rozmývají, začíná vznikat produkt (žlutá). Promíchávání a reagování vzorku s činidlem pokračuje při zpětném toku, kdy reakční směs putuje do průtokové cely, kde je změřen signál produktu. Z detektoru je získán analytický signál ve formě píku, jeho výška je přímo úměrná koncentraci.

Aby byla disperze jednotlivých zón reprodukovatelná (a tudíž aby bylo dosaženo reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu), je nutná přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků.

Při zastaveném toku je možné provádět kinetická měření, např. určovat řád reakcí. Na konci analýzy je celý systém propláchnut rychlým proudem nosného toku.



Obr. 2.7 Princip metody FIA [7]

A – nadávkování vzorku (červená), B – nadávkování činidla (tmavě modrá), C – vznik produktu (žlutá), D – obrácení toku, E – detekce produktu detektorem

Využití

Pomocí SIA je možné stanovit většinu běžných anorganických iontů a čtených organických látek včetně léčiv, iontů ve vodě různého původu (povrchové, pitné, odpadní) za účelem kontroly její kvality, stopová množství některých těžkých kovů, obsah herbicidů [4].

Výhody a nevýhody

Velkou výhodou oproti FIA je nižší spotřeba vzorků a činidel, ke které dochází díky zastavování toku (u FIA jsou čerpány kontinuálně). Výhodné je i jednokanálové uspořádání, kdy je i při použití více reakčních činidel potřeba pouze jedno pístové čerpadlo, jeden ventil. Využívaná počítačová technika je sice poměrně složitá, umožňuje ale jednoduše upravovat mnoho parametrů měření bez nutnosti fyzické rekonfigurace systému [8]. Nevýhodou je naopak snížená frekvence dávkování vzorků (oproti FIA až o polovinu) [3], protože pro nadávkování dalšího vzorku je vždy třeba dokončit předchozí měřicí cyklus, kdežto u FIA je možné dávkovat vzorky do nosného proudu poměrně rychle za sebou.

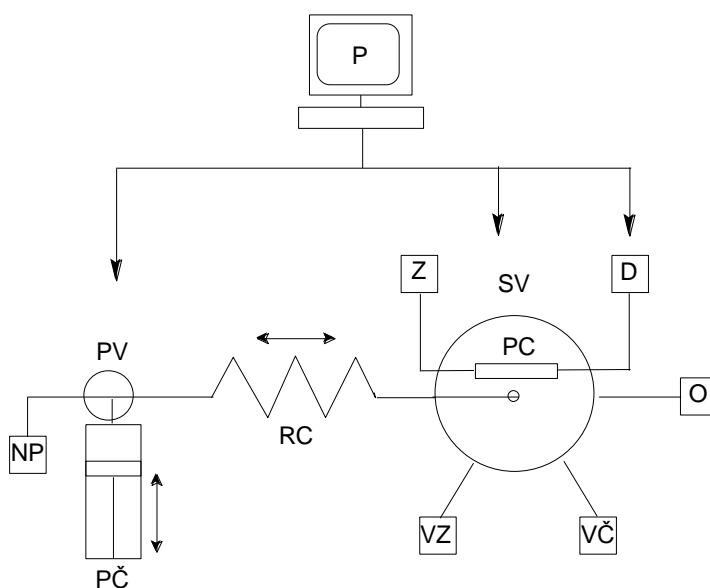
μSIA-LOV

SIA-LOV nebo také μSIA jsou zkratky pro miniaturizovanou variantu sekvenční injekční analýzy. Název LOV je z anglického „lab on valve“ tedy „laboratoř na ventilu“, což znamená, že průtoková cela je umístěna přímo ve vícecestném ventilu.

Mikro sekvenční injekční lab-on-valve koncept je považován za třetí generaci průtokových analýz. Inkorporace detekčního systému do selekčního ventilu je umožněna využitím technologie optických vláken [10]. Vícecestný ventil má jeden centrální vstup, který je obvykle spojen s reakční cívkou (a přes ní dále s pístovou pumpou), a ten umožňuje spojení se všemi ostatními satelitními porty skrz mělké drážky, které jsou na rotujícím povrchu ventilu umístěné [8]. Schematicky je aparatura zakreslena na Obr. 2.8.

SIA-LOV je rychle celosvětově přijímána, protože přichází se zmenšováním měřítka současného SIA uspořádání, s čímž je spojená ještě nižší spotřeba činidel a vzorků. Také umožňuje nové analytické techniky jako je Bead injection, Mikro afinitní chromatografie a Sekvenční injekční chromatografie a zjednodušuje automatizaci spektrofotometrie, atomové spektroskopie, fluorescence, chemiluminiscence a elektrochemických technik [11].

Díky výhodám v nízké spotřebě činidel a vzorků je SIA-LOV perfektním nástrojem pro enzymatické analýzy [10].



Obr. 2.8 Schéma aparatury SIA-LOV

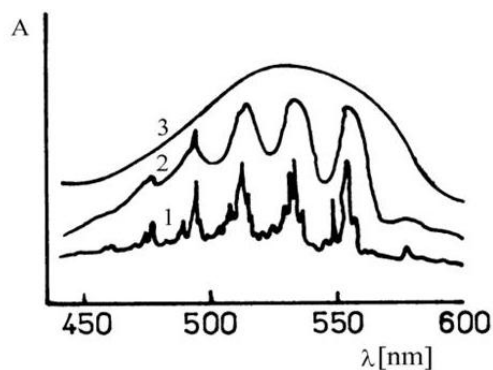
NP – nosný proud destilované vody, PV – přepínací dvoucestný ventil, PČ – průtokové čerpadlo, RC – reakční cívka, Z – zdroj UV-VIS záření, SV – selekční ventil, PC – průtoková cela, D – detektor, O – odpad, VZ – vzorek, VČ – vybarvovací činidlo, P – počítač

2.2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV a Vis oblasti

Molekulová absorpční spektrometrie je analytická metoda založená na absorpci elektromagnetického záření molekulami látek ve viditelné a ultrafialové oblasti.

Je to metoda relativně rychlá, experimentálně nenáročná, přesná a citlivá a běžně se využívá pro stanovení látek v roztocích.

Když molekuly absorbují elektromagnetické záření z ultrafialové nebo viditelné oblasti (v rozsahu 200 až 800 nm), tak dojde k excitaci elektronů v molekule z jejich základního stavu do stavu excitovaného [12]. Protože má toto záření poměrně vysokou energii, tak dokáže excitovat nejen rotační a vibrační ale i elektronové stavy molekuly. Nicméně tyto jednotlivé diskrétní přechody při zaznamenávání spektra většinou splývají (rozlišit je lze jen při měření v plynném stavu, viz obr. 2.9) a výsledné spektrum je pásové. Při měření v roztocích totiž dochází k omezení rotačních a vibračních stavů molekul, protože jsou solvatovány rozpouštědlem. Po excitaci se elektrony opět vrací do základního stavu, a to různými zářivými i nezářivými deexcitačními přechody.



Obr. 2.9 Absorpční spektra symetrického tetracenu, $C_2H_2N_4$ v plynném stavu (1), v roztoku cyklohexanu (2) a ve vodném roztoku (3); převzato z [6]

Látky absorbující elektromagnetické záření v UV oblasti (méně než 380 nm) se jeví lidskému oku jaké bezbarvé, látky absorbující ve viditelné oblasti vidíme jako barevné (380 až 770 nm). Barva roztoku, kterou vidíme, je doplňková (komplementární) k barvě (vlnovým délkám), které látka absorbuje. Viz Tab. 2.1.

Tab. 2.1: Barvy absorbovaného a komplementárního záření a příslušné vlnové délky (převzato z [12])

Absorbované záření (nm)	Barva absorbovaného záření	Barva doplňková (komplementární) = barva roztoku
400–435	fialová	žlutozelená
435–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červenooranžová
500–560	zelená	purpurová
560–580	zelenožlutá	fialová
580–595	žlutooranžová	modrá
595–610	červenooranžová	zelenomodrá
610–750	červená	modrozelená

Aby byla látka měřitelná pomocí molekulové absorpční chromatografie, musí v molekule obsahovat tzv. chromofor a mít hodnotu molárního absorpčního koeficientu ε větší než 1000 l/(cm·mol). Chromofor je určitá charakteristická skupina v molekule, která je schopna absorbovat záření. Chromoforem můžou být například konjugované alkeny, alkiny, karbonylová, azo, nitro a nitroso skupina [6]. Látky, které nesplňují tyto dva předpoklady, musejí být na vhodnou sloučeninu převedeny tzv. spektrofotometrickou reakcí (zavedení vhodného chromoforu do molekuly, převedení do vhodného komplexu) [6].

Podle své struktury absorbuje chromofor při určitých vlnových délkách a na tom je založena kvalitativní analýza. Kvalitativní analýza pouze podle chromoforů je ovšem obtížná a není jednoznačná (je ovlivněna substituenty i použitým rozpouštědlem), nutná je kombinace například se separačními technikami a následně porovnání s výsledky získanými například hmotnostní spektrometrií nebo nukleární magnetickou rezonancí.

Nejvíce je molekulární absorpční spektrometrie využívána ke kvantitativní analýze [6]. Podíl toku monochromatického záření propuštěného látkou po absorpci Φ k toku vstupujícího záření Φ_0 je definován jako propustnost neboli transmitance T ,

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (2.1)$$

její záporný dekadický logaritmus se pak nazývá absorbance A .

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (2.2)$$

Vztah mezi absorbancí a koncentrací popisuje Lambertův-Beerův zákon

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot L \quad (2.3)$$

kde c je koncentrace [mol/l], ε molární absorpční koeficient [l/(cm·mol)] a L je délka absorbujícího prostředí [cm]. Podle tohoto vztahu je možné stanovovat látky v čirém roztoku o koncentraci nižší než 10^{-2} mol/l. Pro stanovení látky je nutno znát její absorpční maximum λ_{max} , (proměřením celého spektra), koncentraci látky je možné zjistit z kalibrační křivky, výpočtem pomocí jednoho roztoku standardu, výpočtem z Lambertova-Beerova zákona (ε je nutno určit experimentálně) nebo metodou standardního přídatku.

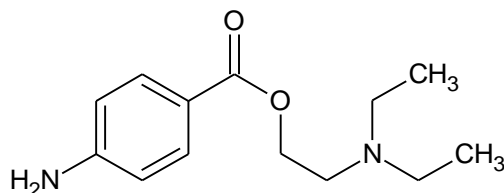
2.3 Prokain

2.3.1 Prokain – látka a její vlastnosti

Prokain, také známý pod obchodním názvem Novokain [13], je prvním synteticky vyrobeným injekčně podávaným lokálním anestetikem. Byl vyroben v roce 1905 Alfredem Einhornem [14]. Na začátku 20. století nahradil do té doby používaný návykový a toxický kokain. Je rychle působícím široce využívaným anestetikem, nejčastěji v orální chirurgii (prokain hydrochlorid). Také se používá pro prodloužení účinnosti intramuskulární injekce penicilinu [15], Základní a aplikovaná farmakologie] a v kombinaci s chloridem draselným a hexahydrátem chloridu hořečnatého působí jako kardioplegický roztok (zastavuje srdeční činnost) [16]. Má však některé nevýhody, jako je pomalý nástup, krátkodobý účinek, vazodilatační efekt a může způsobovat alergické reakce. Z těchto důvodů je v České republice upouštěno od jeho používání a v zubní chirurgii ho nahrazuje lidokain, nicméně v zahraničí se používá stále běžně [14]. V České republice se s ním můžeme setkat také ve veterinární praxi [17]. Prokain je nutné aplikovat injekčně, neprostupuje sliznicí [14].

Fyzikální a chemické vlastnosti, farmakologie

Prokain, systematickým názvem 2-diethylaminoethyl p-aminobenzoat je aminoester se strukturním vzorcem (Obr. 2.10)



Obr. 2.10 Strukturní vzorec prokainu

a sumárním vzorcem $C_{13}H_{20}N_2O_2$. Molekulová hmotnost prokain hydrochloridu je 272,77 g/mol. pK_a při 20°C je 9,0. Teplota tání je 154 °C až 158 °C. Je to bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96 %, mírně rozpustný v chloroformu a prakticky nerozpustný v etheru. Při skladování musí být chráněn před světlem [18, 13].

Metabolizuje se v krvi působením pseudocholinesterázy z 80 % na kyselinu paraaminobenzoovou, z 8 % na diethylaminoethanol a 2 % zůstávají nezměněna. Metabolity jsou vylučovány močí. Právě kyselina paraaminobenzoová je příčinou občasných alergických reakcí [14].

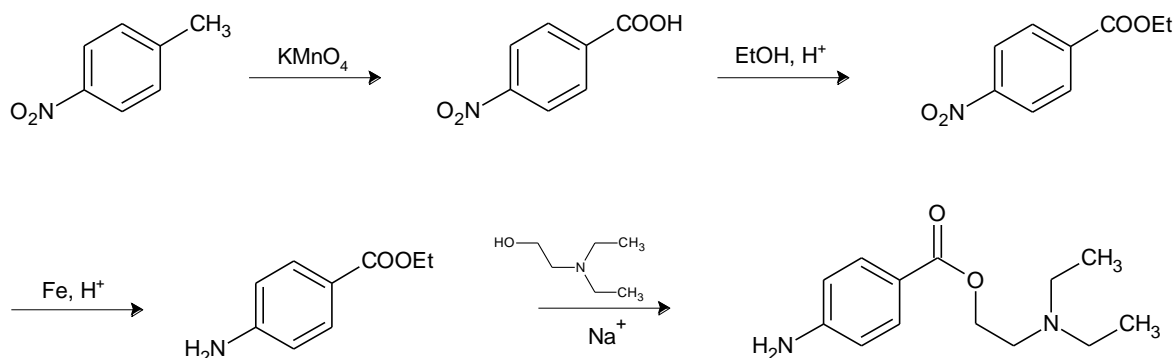
Prokain reverzibilně blokuje impulzy vedoucí podél axonů a ostatních vzrušivých membrán, které využívají sodíkové kanály jako primární prostředek pro generaci akčního potenciálu. Když je příliv sodíku přerušen, nevzniká akční potenciál a vedení signálu je tak zablokováno. A tím je blokována bolest z daných částí těla [19, 20].

Prokain prostupuje tkání jako nenabitá molekula a intracelulárně působí ve formě kationtu.

Pro dosažení vhodného času nástupu a trvání účinku lokální anestezie bývá často prokain používán v kombinaci s dalšími anestetiky, jako jsou lidokain, ropivakain, tetrakain, bupivakain, propoxykain nebo epinefrin. Také se kombinuje s vazokonstriktorem korbadrinem [21].

Syntéza

Syntéza prokainu začíná oxidací p-nitrotoluenu na p-nitrobenzoovou kyselinu, následuje esterifikace s ethanolem a redukce nitroskupiny za vzniku ethyl-4-aminobenzoátu (benzokainu). Posledním krokem je bazicky katalyzovaná transesterifikace 2-(diethylamino)ethanolem [22].



Obr. 2.11 Syntéza prokainu z p-nitrotoluenu (převzato z [22])

Dávkování

Prokain se používá pro lokální anestezii infiltrační (intramuskulárně) nebo svodnou anestezii tenkých nervů a nervových pletení (do blízkosti nervových kmenů). Dávka k infiltraci pro dospělé je 60 ml 0,5% roztoku, pro periferní svodnou anestezii je to 100 ml 0,5% nebo 50 ml 1% roztoku [15].

Lékové formy dostupné v ČR

V České republice se dá prokain sehnat jako prokain hydrochlorid od firmy Ardeapharma v 0,2; 0,5 % injekčních roztocích (Injectio procainii chlorati 0,2%; Injectio procainii chlorati 0,5%). Od stejné firmy je také dostupný v kombinaci s penicilinem jako prášek pro injekční suspenzi (Prokain penicilin G 1,5 Biotika) a v kombinaci s chloridem draselným a hexahydrátem chloridu hořečnatého jako koncentrát pro infuzní roztok (Solutio thomas cum procaino) [23]. Prokain hydrochlorid je také vyráběn pro veterinární ambulance jako injekční roztok od firmy Bioveta (Procain bioveta) [17].

2.3.2 Stanovení prokainu

Prokain lze stanovovat mnoha způsoby. Za oficiální metody jsou považovány způsoby stanovení popsané v lékopisech.

Podle českého [18], evropského [24] a mezinárodního [25] lékopisu se prokain stanovuje titrací dusitanem sodným. Konkrétně se prokain podle českého lékopisu stanovuje rozpuštěním 0,400 g prokainu v 50 ml 5,8% kyseliny chlorovodíkové a provede se stanovení primárních aromatických amínů. 1,0 ml dusitanu sodného 0,1 mol/l odměrného roztoku odpovídá 27,28 mg prokain hydrochloridu. Primární amíny se stanovují následovně: Předepsané množství zkoušené látky se rozpustí v 50 ml 5,8% kyseliny chlorovodíkové nebo v jiném předepsaném rozpouštědle a přidají se 3 g bromidu draselného. Ochladí se ve vodě s ledem a pomalu se titruje dusitanem sodným 0,1 mol/l odměrným roztokem za stálého míchání. Indikace bodu ekvivalence se provádí elektrometricky nebo za použití předepsaného indikátoru (upraveno z [18]).

Lékopis USA uvádí extrakci rozpouštědlem následovanou spektrofotometrickým měřením absorpance prokain hydrochloridu při 280 nm [26]. Čínský lékopis stanovuje prokain pomocí titrace do konečného bodu [26]. Lékopis Velké Británie uvádí stanovení prokainu pomocí elektrometrické titrace [26].

SPEKTROFOTOMETRICKÁ DETEKCE

Stanovení prokainu reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem [26]

Reakcí prokainhydrochloridu s p-dimethylaminobenzaldehydem v prostředí ledové kyseliny octové vzniká žlutá Schiffova báze, kterou je možno spektrofotometricky detekovat při 455 nm. $\epsilon_{455} = 3,46 \cdot 10^4$, mez detekce 0,1 $\mu\text{g/ml}$, lineární dynamický rozsah 0,2 až 15 $\mu\text{g/ml}$. Jednoduchá, rychlá metoda, výsledky odpovídají oficiální metodě (titrace do mrtvého bodu). Vhodné pro stanovení prokainu v injekčních roztocích prokain hydrochloridu.

Stanovení prokainu reakcí s kyselinou 1,2-naftochinon-4 sulfonovou [1]

Reakcí prokainhydrochloridu s 1,2-naftochinon-4-sulfonovou kyselinou vzniká oranžový produkt, který lze spektrofotometricky detekovat při 484 nm. $\epsilon_{484} = 5,22 \cdot 10^3$, mez detekce 0,28 $\mu\text{g/ml}$, lineární dynamický rozsah 0,30 až 100 $\mu\text{g/ml}$. Jedná se o jednoduchou

a rychlou metodu, kterou lze použít na stanovení prokainu v injekčních roztocích prokainu hydrochloridu. Také je vhodná pro stanovení prokainu v léčivech a v biologických materiálech (např. v krvi), protože produkt této reakce absorbuje ve viditelném záření (484 nm) a ne v UV jako samotný prokain (280 nm), kde absorbují léčiva obecně a tudíž nedochází k interferenci. Výsledky získané touto metodou odpovídají výsledkům získaným oficiální metodou (titrací do mrtvého bodu).

Stanovení prokainu reakcí s ceričitými ionty [2]

Reakcí prokainu s ceričitými ionty v prostředí kyseliny sírové vzniká červený produkt, který lze spektrofotometricky detekovat. Jelikož je produkt nestabilní, je vhodné použití sekvenční injekční analýzy. Mez detekce je 7,4 µg/ml, lineární dynamický rozsah 9,7 až 116,6 µg/ml. Vhodné pro stanovení prokainu v tabletách a injekcích, výsledky porovnatelné se standardní metodou (titrace do mrtvého bodu).

Stanovení prokainu reakcí s p-benzochinonem [27]

Metoda je založená na reakci prokainu s p-benzochinonem ve vodném kyselém prostředí za vzniku charge-transfer komplexů. Mez detekce je 5,0-90 µg/ml, komplex má molární absorpční koeficient $2,42 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Metoda je svojí přesností srovnatelná s Britským lékopisem (2003) a je vhodná pro stanovení prokainu v přítomnosti produktů jeho degradace, přísad a pomocných látek běžně obsažených ve farmaceutických přípravcích.

Stanovení prokainu za katalýzy hemoglobinem [28]

Prokain působí jako inhibitor na reakci peroxidu vodíku s kyselinou 4,5-dihydroxy-3-[(2-hydroxy-5-sulfofenyl)azo]-2,7-naftalendisulfonovou kyselinou, resp. s její trisodnou solí (angl. acid chrom blue K, ACBK) katalyzovanou hemoglobinem. Míra inhibice zmíněné reakce vyjádřená v procentech (I [%]) je za optimálních podmínek přímo úměrná koncentraci přítomného prokainu. Lineární dynamický rozsah je $1,50 \cdot 10^{-7}$ až $4,15 \cdot 10^{-6}$ mol/l (~ 0,04 až 0,98 µg/ml), mez detekce je $3,80 \cdot 10^{-8}$ mol/l (~ 0,90 ng/ml). Metoda může být použita pro stanovení prokainu v injekčních roztocích prokainu hydrochloridu.

FLUORIMETRICKÁ DETEKCE

Stanovení prokainu reakcí s fluorescaminem [29]

Přirozená fluorescence prokainu je nízká, proto se využívá derivatizační reakce, kdy prokain reaguje s fluorescaminem za vzniku produktu, který již lze fluorescenčně detekovat. Mez detekce je 7,7 ng/ml. Metoda může být použita pro analýzu prokainu přímým měření fluorescence, bez interference ostatních složek. Lze ji využít pro stanovení prokainu ve farmaceutických preparátech s uspokojivými výsledky.

Stanovení prokainu pomocí karboxymethyl- β -cyklodextrinu [30]

Pokud zvýšíme přirozenou fluorescenci prokainu pomocí karboxymethyl- β -cyklodextrinu (CM- β -CD), můžeme ho fluorimetricky detekovat. Mez detekce je 1 ng/ml.

Metoda se zabývá i separací prokainu, neboť matrice může způsobovat interference, které by při praktické aplikaci metody překážely. Jedná se o separaci prokainu na RP-HPLC, koloně Alltima, stacionární fáze je oktadecylsilika a mobilní fáze je CM- β -CD v methanolu. Negativně nabitý CM- β -CD a pozitivně nabitý prokain vytváří komplex, jehož retenční mechanismus byl studován.

Stanovení prokainu pomocí 4-aminobenzoátu [31]

Použití fluorescenční spektrofotometrie pro stanovení prokainu umožňují fluorescenční vlastnosti 4-aminobenzoátu, který je produktem hydrolyzy prokainu při pH 12. Excitační vlnová délka je 268 nm, emisní 340 nm. Mez detekce je 49 ng/ml. Metoda je vhodná pro stanovení prokainu v injekčních roztocích prokain hydrochloridu.

CHEMILUMINISCENČNÍ DETEKCE

Stanovení prokainu reakcí s manganistanem draselným [32]

Prokain lze stanovit chemiluminiscenčně pomocí sekvenční injekční analýzy. Chemiluminiscence prokainu je emitována při jeho oxidaci manganistanem draselným v kyselině sírové za přítomnosti kyseliny mravenčí, která zvyšuje chemiluminiscenci prokainu. Byl použit dvojitý zpětný tok, signál byl zaznamenán nad vlnovou délkou 390 nm. Mez detekce byla 0,3 μ g/ml, lineární dynamický rozsah 0,5–50 μ g/ml. Metoda je vhodná pro stanovení prokainu v lékové formě, výsledky jsou porovnatelné se standardní metodou (titrace do mrtvého bodu).

Stanovení prokainu inhibicí chemiluminiscence [33]

Prokain je detekován snížením intenzity chemiluminiscence při jeho reakci se systémem luminol–H₂O₂. Inhibici chemiluminiscence ještě podporuje přidavek β-cykloextrinu. Detekce probíhá v uspořádání průtokové injekční analýzy. Mez detekce je 0,08 µg/ml. Metoda je vhodná pro stanovení prokainu v injekčních roztocích prokain hydrochloridu.

VOLTAMETRICKÁ DETEKCE

Stanovení prokainu modifikovanou uhlíkovou elektrodou – CV [34]

Prokain lze stanovit pomocí cyklické voltametrie na skleněné uhlíkové elektrodě (GCE) pokryté MWNT filmem (multi-wall carbon nanotube), kde dochází k oxidaci prokainu. Mez detekce je $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l (~ 0,047 µg/ml). Metodu je možné využít pro stanovení prokainu v injekčních roztocích prokain hydrochloridu

Stanovení prokainu modifikovanou uhlíkovou elektrodou – DPV [20]

Stanovení prokainu diferenční pulsní voltametrií s využitím pemzou modifikované uhlíkové pastové elektrody. Mez detekce je $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l (~ 0,01 µg/ml). Metoda je vhodná pro stanovení prokainu ve farmaceutických produktech, prokainových injekcích a vzorcích moči.

Stanovení prokainu modifikovanou uhlíkovou elektrodou – DPV, SWV [35]

Byla použita uhlíková elektroda v uspořádání screen-printed (SPE), nemodifikovaná nebo modifikovaná p-tercetyl-diester-kalix[4]arenem (C4Es2). Lineární dynamický rozsah u DPV byl 3-750 µmol/l a mez detekce 0,91 µmol/l. Lineární dynamický rozsah při SWV byl 1-250 µmol/l a mez detekce 0,4 µmol/l. Interferenční studie ukázaly lepší selektivitu pro stanovení prokainu u elektrod modifikovaných C4Es2 v porovnání s elektrodami nemodifikovanými. Metoda je vhodná ke stanovení prokainu ve farmaceutických přípravcích.

AMPEROMETRICKÁ DETEKCE

Stanovení prokainu pomocí tištěné uhlíkové elektrody [36]

Prokain je stanovován v uspořádání průtokové injekční analýzy a detekován je ampérometricky pomocí screen-printed uhlíkové elektrody. Metoda je založena na oxidaci

skupiny aminu/hydroxylaminu z prokainu při 0,8 V v roztoku octanu sodného při pH 6,0. Mez detekce je $6,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l ($\sim 1,4$ $\mu\text{g/ml}$), lineární dynamický rozsah $9,0 \cdot 10^{-6}$ až $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (2,13 až 23,6 $\mu\text{g/ml}$). Metoda je vhodná pro stanovení prokainu ve farmaceutických přípravcích bez potřeby předchozích úprav.

HMOTNOSTNÍ DETEKCE

Stanovení prokainu v biologických vzorcích pomocí izotopové rozpouštěcí hmotnostní spektrometrie [37]

Metoda byla využita pro in-vitro farmakokinetické studie metabolismu prokainu v homogenátu z krysích jater. Jedná se rychlou metodu (6 změřených vzorků za hodinu), kdy není nutná derivatizace vzorku (narozdíl od měření pomocí GC-MS). Mez detekce je 10 ng/ml, lineární dynamický rozsah 0 až 40 $\mu\text{g/ml}$. Poměr signál-šum 5:1. Jako interní standard byl využit ^{15}N prokain, měření bylo s teplotním programem.

Stanovení prokainu separací plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí [38]

Metoda popisuje simultánní stanovení sedmi různých druhů lokálních anestetik, mezi nimi i stanovení prokainu. Látky jsou nejprve separovány pomocí plynové chromatografie s extrakcí na pevné fázi a poté detekovány na hmotnostním spektrometru. Na koloně dochází k jasnému oddělení všech anestetik. Mez stanovení prokainu byla 100 ng/ml. Metoda je aplikovatelná na vzorky plazmy a moči.

RESONANČNÍ RAYLEIGHŮV ROZPTYL (RRS)

Stanovení prokainu pomocí HPLC v lidské plazmě [39]

Prokain lze stanovit v lidské plazmě po separaci na HPLC detekcí na RRS. Nízká intenzita RRS prokainu byla zvýšena přidávkem diiodofluoresceinu (angl. acid red 95, Erythrosin Yellowish) v kyselém mediu o pH 4,4. RRS signál byl detekován při 370 nm. Lineární dynamický rozsah je od 0,005 do 15,375 $\mu\text{g/ml}$ a mez detekce je 2,3 ng/ml. Metoda je vhodná pro stanovení prokainu v lidské plazmě.

3 Experimentální část

3.1 Používané přístroje, zařízení a programy

Při přípravě vzorků byly využívány semi-mikro analytické váhy Sartorius RC 210 D (Sartalex, ČR) a pH metr AD 1000 (Adwa, Maďarsko). Pro zpracování dat sloužil Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA), Origin 6.0 (OriginLab, USA) a ACD/ChemSketch 12.0 (ACD/Labs, Kanada).

Statické uspořádání

Měření ve statickém uspořádání bylo prováděné na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies 2001-2010, USA) s termostatovanou kyvetou. Ovládacím programem byl UV-Visible ChemStation B.04.01 (61) (Agilent Technologies 2001-2010, USA).

Měření pomocí hmotnostního spektrometru

Pro ověřování produktu reakce prokainu s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou byl použit hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, SRN) s ionizací elektrosprejem (ESI, Electrospray Ionization).

Ovládacím softwarem byl MassHunter Workstation (Agilent Technologies, USA).

Průtokové injekční uspořádání (FIA)

Pro měření v průtokovém injekčním uspořádání byla využita laboratorně sestavená aparatura, která byla složená z peristaltické pumpy Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument Company), průtokové 1 cm Z-cely (Ocean Optic, USA), ze zdroje záření DT-MINI-2GS s rozsahem vlnových délek 200-1100 nm s vláknovou optikou (Ocean Optics, USA), spektrometru HR 4000 (Ocean Optic, USA) a optických vláken QP-600-2-UV/VIS-SR o průměru 600 μm (Ocean Optics, USA), šesticestného nízkotlakého dávkovacího ventilu 5125 (Rheodyna, USA), PTFE dávkovacích a reakčních smyček (vlastní zhotovení) o objemu 100, 150, 200, 250 a 500 μl o vnitřním průměru 0,5 mm (VICI Valco, USA) a tygonových hadiček (vnitřní průměr 0,76 mm).

K ovládání byl použit program SpectraSuite (Ocean Optics, USA).

Sekvenční injekční uspořádání (SIA)

Pro měření pomocí SIA-LOV byla použita komerční aparatura FIALab 3500 (FIALab Instruments, USA) s vlastním ovládacím softwarem. Absorpční spektra byla zaznamenávána pomocí programu SpectraSuite (Ocean Optics, USA).

3.2 Použité chemikálie, příprava roztoků

Pro měření byly použity následující chemikálie:

- prokain hydrochlorid (Ph. Eur. referenční standard, Fluka)
- injekční roztok prokain hydrochloridu 0,2%, Ardeapharma, číslo šarže: 0303080713
- injekční roztok prokain hydrochloridu 0,5%, Ardeapharma, číslo šarže: 0103030913
- kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, sodná sůl p.a. (Lachema, ČR)
- dodecylsulfát, sodná sůl (Serva, SRN)
- ethanol, pro spektroskopii (Merck, SRN)
- kyselina octová, $\geq 99,8\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- octan sodný, krystalický, čistý (Lachema, ČR)
- hydroxid sodný p.a. (Chemapol, ČR)
- kyselina chlorovodíková 37% (Sigma-Aldrich, USA)

Zásobní roztok prokainu $C_{13}H_{20}N_2O_2 \cdot HCl$ ($M_r = 272,77$) o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$ byl připraven odvážením 0,1 g prokainu a doplněním po rysku do 100 ml odměrné baňky destilovanou vodou. Roztok byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

Zásobní roztok vybarvovacího činidla byl připraven odvážením 0,2 g kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové a doplněním po rysku ve 100ml odměrné baňce destilovanou vodou. Výsledná koncentrace byla 2000 $\mu\text{g/ml}$, roztok byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

Acetátový pufr o pH 3,3 byl připraven odvážením 0,29 g octanu sodného (CH_3COONa , $M_r = 82,03$) a odměřením 3 ml ledové kyseliny octové (CH_3COOH , $M_r = 60,05$) do 500ml odměrné baňky, doplněné po rysku destilovanou vodou.

Roztok surfaktantu byl připraven odvážením 0,1 g sodiumdodecylsulfátu (SDS) do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou. Jeho koncentrace byla 1000 $\mu\text{g/ml}$.

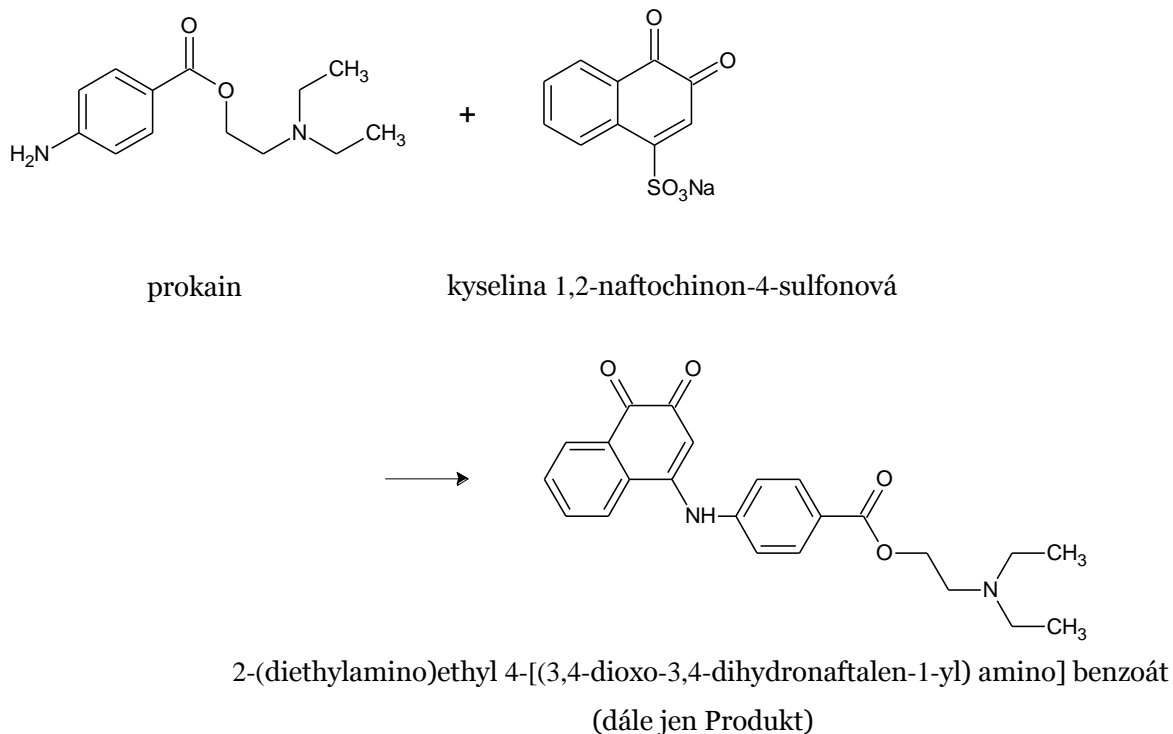
Reálné vzorky jsou vyfoceny na Obr. 3.1, byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.



Obr. 3.1 Fotografie použitých lékových forem prokainu k analýze

3.3 Vybarvovací reakce

Za účelem dosažení nízké meze detekce stanovení prokainu spektrofotometricky pomocí SIA byla vybrána reakce, kdy prokain reaguje s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou za vzniku oranžového produktu 2-(diethylamino)ethyl 4-[(3,4-dioxo-3,4-dihydronaftalen-1-yl) amino] benzoátu, dále jen Produktu (Obr. 3.2), který má absorpční maximum při vlnové délce 484 nm [1]. Jedná se o nukleofilní substituci.



Obr. 3.2 Reakce prokainu s vybarvovacím činidlem (převzato z [1])

3.4 Uspořádání měření a experimentální aparatura

3.4.1 Statické uspořádání

Cílem tohoto měření bylo ověření platnosti reakce a parametrů měření popsanych v článku, ze kterého se při stanovení vychází [1].

Měření probíhalo na přístroji Agilent 8453, který byl ovládán pomocí programu UV-Visible ChemStation, při zapnuté halogenové i deuteriové lampě. Byla používána 1cm křemenná kyveta. Celé spektrum bylo měřeno v rozsahu 200-800 nm, vzorek po reakci s vybarvovacím činidlem absorbuje jak v UV, tak i ve Vis oblasti. Pro měření byla vybrána vlnová délka 484 nm.

Měření teplotní závislosti, časové závislosti a měření s přísavky SDS a ethanolu byla prováděna tak, že vzorek v kyvetě byl umístěn do kyvetového prostoru spektrofotometru. Tento prostor byl při měření teplotních závislostí termostatován. Vzorkem bylo po celou dobu mícháno.

3.4.2 Měření pomocí hmotnostního spektrometru

Podle publikace, z níž tato práce vychází [1], reaguje prokain hydrochlorid s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou za vzniku 2-(diethylamino)ethyl 4-[(3,4-dioxo-3,4-dihydronaftalen-1-yl) amino] benzoátu, viz Obr. 3.2.

Bylo třeba ověřit, jestli skutečně vzniká tato látka, nebo jestli nevzniká jiný produkt. Pro tento účel byla zvolena metoda hmotností spektrometrie.

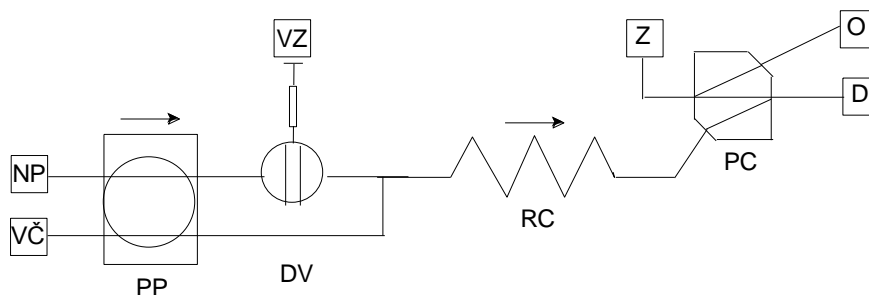
Měření byla prováděna ve SCAN módu, který pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. Kvadrupól propustí na detektor všechny ionty ve zvoleném m/z rozsahu a tím se získá celkové hmotnostní spektrum. Bylo měřeno v rozmezí m/z 100 až 500, parametry iontového zdroje byly: teplota sušícího plynu 330 °C, průtok sušícího plynu 10 l/min, tlak nebulizéru 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V. Napětí na fragmentoru bylo nastaveno na 135 V. Vzorek o objemu 1 µl byl dávkován pomocí LC do průtoku mobilní fáze o složení 60 % H₂O, 40 % methanol. Všechna měření byla prováděná v pozitivním i negativním módu.

3.4.3 Průtokové injekční uspořádání

Nosný proud acetátového pufru byl veden pomocí peristaltické pumpy Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument Company) do dávkovací smyčky. Do ní byl přes šesticestný

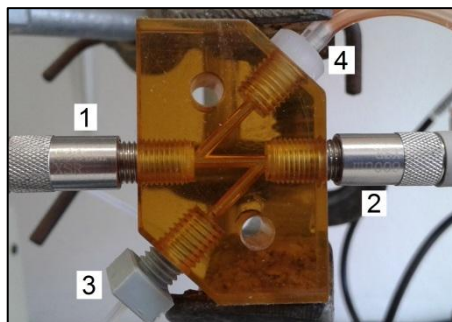
nízkotlaký ventil dávkován prokain pomocí injekční stříkačky. V poloze „Load“ bylo možné dávkovací smyčku naplnit. V poloze „Inject“ byl nosný tok veden přes dávkovací smyčku. Za dávkovací smyčku byl připojen tok vybarvovacího činidla, které bylo čerpáno stejnou peristaltickou pumpou jako roztok prokainu. Následovala reakční cívka. Zde byl tok zastavován vypnutím pumpy, tzv. technika stop-flow, z důvodu dostatečného vybarvení prokainu. Obsah reakční cívky byl dále transportován do průtokové Z-cely. Signál byl detekován pomocí spektrometru HR 4000 (Ocean Optic, USA) jako pík při 484 nm, měřena byla absorbance. Základní linií byl signál acetátového pufru s vybarvovacím činidlem. Na tuto směs byl spektrometr nulován. Ve zdroji záření DT-MINI-2GS 200-1100 nm byla využívána halogenová i deuteriová lampa. V programu SpectraSuite (Ocean Optics, USA) byl nastaven integrační čas 100 milisekund.

Celou aparaturu můžeme vidět na Obr. 3.3, na Obr. 3.4 pak průtokovou Z-celu.



Obr. 3.3 Schéma aparatury FIA se spektrofotometrickou detekcí

NP – nosný proud acetátového pufru, VČ – vybarvovací činidlo = kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, PP – peristaltická pumpa, VZ – vzorek = prokain, DV – dávkovací šesticečný ventil, RC – reakční cívka, Z – zdroj UV-VIS záření, PC – průtoková Z-cela, O – odpad, D – detektor



Obr. 3.4 Průtoková Z-cela

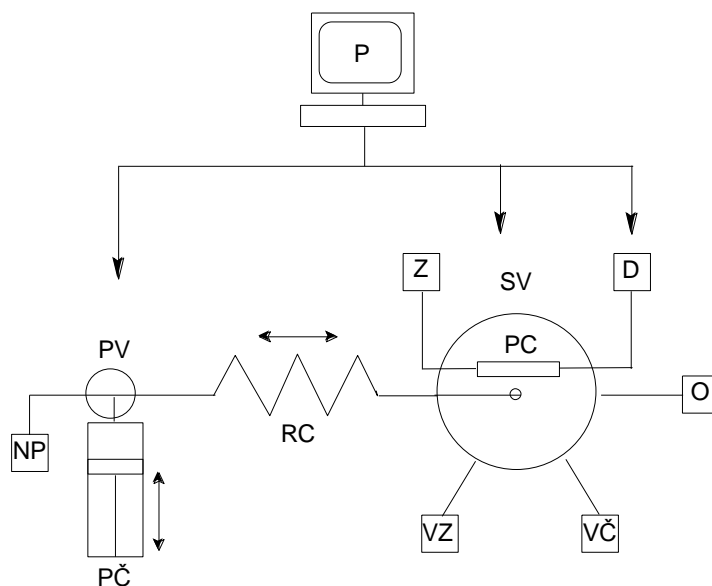
1 – záření vstupující optickým vláknem do cely, 2 – optické vlákno vedoucí do detektoru, 3 – vstup nosného toku (z reakční cívky), 4 – odpad

3.4.4 Sekvenční injekční uspořádání

Aparatura pro měření SIA-LOV byla komerčně sestavená aparatura FIA/SIA FIA Lab 3500 (FIALab Instruments).

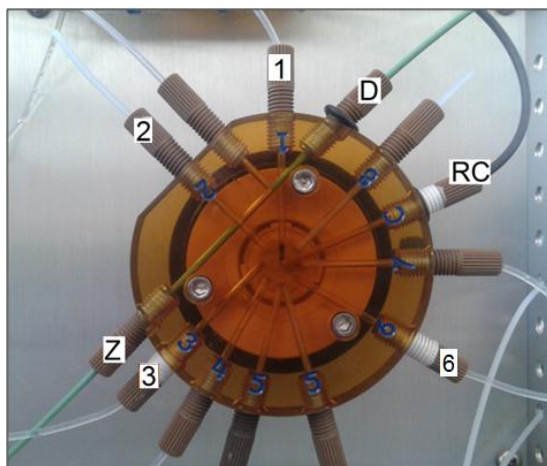
Sestávala se z externího zdroje záření DT-MINI-2GS (Ocean Optic), optických vláken, externího detektoru HR 4000 (Ocean Optic), 1ml pístové pumpy, vícecestného ventilu, ve kterém byla zabudována průtoková cela (SIA-LOV) a z přepínacího dvoucestného ventilu propojujícího zásobní láhev destilované vody s reakční cívkou a vícecestným ventilem.

Schéma aparatury je na Obr. 3.5, obrázek vícecestného ventilu na Obr. 3.6.



Obr. 3.5 Schéma aparatury SIA-LOV

NP – nosný proud destilované vody, PV – přepínací dvoucestný ventil, PČ – pístové čerpadlo, RC – reakční cívka, Z – zdroj UV-VIS záření, SV – selekční ventil, PC – průtoková cela, D – detektor, O – odpad, VZ – vzorek = prokain, VČ – vybarvovací činidlo = kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, P – počítač



Obr. 3.6 SIA-LOV ventil

1 – odpad, 2 – průtoková cela, 3 – vybarvovací činidlo, 6 – vzorek, RC – reakční cívka,
D – optická vlákna vedoucí do detektoru, Z – záření vstupující optickými vlákny do cely

Každý den před měřením byla aparatura několikrát promyta destilovanou vodou. Měřicí proces sestával z následujících kroků, popsaných v Tab. 3.1.

Tab. 3.1 Kroky měřicího procesu v SIA

Krok č.	Pozice přepínacího ventilu	Pístová pumpa	Děj	Pozice vícecestného ventilu
1	out	-	počet smyček: 3	-
2	out	-	čekání 3 s	-
3	out	16 μ l/s; x μ l	nasávání	3: vybarvovací činidlo
4	out	-	čekání 2 s	-
5	out	5 μ l/s; 5 μ l	proti vzniku bublinek	-
6	out	16 μ l/s; x μ l	nasávání	6: vzorek
7	out	-	čekání 300 s	-
8	in	250 μ l/s; celý objem	nasávání	-
9	out	25 μ l/s; celý objem	vypouštění	2: průtoková cela
10	in	250 μ l/s; celý objem	nasávání	-
11	out	25 μ l/s; celý objem	vypouštění	2: průtoková cela
12	in	200 μ l/s; celý objem	nasávání	-
13	out	75 μ l/s; celý objem	vypouštění	2: průtoková cela
14	out	-	konec smyčky	-

pozice přepínacího ventilu out – propojení pístové pumpy s reakční cívkou a vícecestným ventilem,

pozice přepínacího ventilu in – propojení pístové pumpy se zásobní lahví destilované vody,

objem x μ l – optimalizovaný parametr

Každé měření bylo opakováno třikrát. Signál byl detekován pomocí spektrometru HR 4000 (Ocean Optic, USA) jako pík při 484 nm, měřena byla absorbance. Zapnuta byla halogenová i deuteriová lampy. Vždy byl nejprve změřen blank. Měření blanku probíhalo stejně jako proces uvedený v Tab. 3.1, jen místo prokainu byl nasán požadovaný objem destilované vody a v kroku č. 7 bylo čekání nastaveno na 5 s. Signál blanku byl pak vždy od signálu vzorku odečítán.

3.5 Statistické zpracování dat

Pro zpracovávání výsledků byly použity následující statistické metody.

Každé měření bylo opakováno třikrát, jako výsledek je uváděn medián, chybové úsečky byly vyjádřeny formou směrodatné odchylky.

Aritmetický průměr, \bar{x}

Je odhadem očekávané hodnoty, který skoro úplně odstraňuje vliv náhodných chyb. Pro malý počet měření (n) je však příliš závislý na malých odchylkách od předpokládaného rozdělení pravděpodobnosti [40]. Vypočítá se jako podíl součtu všech naměřených hodnot (x_i) a jejich počtu (n):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.1)$$

Medián, \tilde{x}

Medián je odhadem očekávané hodnoty. Je to střední hodnota z výběru seřazeného podle velikosti, kdy $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$ v případě lichého počtu výsledků měření, při sudém počtu výsledků měření se medián vypočítá jako aritmetický průměr prostředních dvou hodnot. Není příliš závislý na malých odchylkách od předpokládaného rozdělení pravděpodobnosti, ale při jeho určení z velkého souboru dat dochází ke ztrátám informace, obsažené ve všech mimo jediného výsledku, protože do výpočtu mediánu nejsou zahrnuty. Proto se používá u menších souborů dat [40].

Směrodatná odchylka, s

Směrodatná odchylka charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou vyskytnout výsledky opakovaných měření, neboli rozptýlení jednotlivých výsledků okolo očekávané hodnoty [40]. Z teorie chyb plyne, že v intervalu $\langle \text{střední hodnota} \pm 1s \rangle$ se vyskytuje 68 % všech výsledků, v intervalu $\langle \text{střední hodnota} \pm 3s \rangle$ již prakticky všechny výsledky. Čím je tedy směrodatná odchylka menší, tím jsou výsledky soustředěny těsněji kolem střední hodnoty, a tudíž měření je přesnější [6].

Pro menší soubory hodnot ($n < 7$) se směrodatná odchylka odhaduje z rozpětí souboru výsledků R . Vypočítá se vynásobením rozpětí souboru tabelovaným koeficientem k_n

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (3.2)$$

$$s = k_n \cdot R \quad (3.3)$$

Pro větší soubory hodnot ($n > 7$) se směrodatná odchylka vypočítá podle vztahu

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (3.4)$$

Relativní směrodatná odchylka, s_r

Relativní směrodatná odchylka vztahuje přesnost měření k velikosti střední hodnoty [6]. Vyjadřuje se v procentech. Vypočítá se jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru (pro soubory větších hodnot, $n > 7$) nebo mediánu (pro soubory menších hodnot, $n < 7$).

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

Interval spolehlivosti, $L_{1,2}$

Interval spolehlivosti udává, že skutečná hodnota leží s určitou zvolenou pravděpodobností (zpravidla 95%) uvnitř stanoveného intervalu [6]. Interval spolehlivosti vychází tím širší, čím větší je pravděpodobnost, že v něm leží správná odhadovaná hodnota [40]. Pro soubory menších hodnot ($n < 7$) se vypočítá jako násobek rozpětí R

a tabelovaného koeficientu K_n (vztah 3.7), pro soubory větších hodnot ($n < 7$) se vypočítá dle vztahu 3.8, kde t je tabelovaný koeficient.

$$L_{1,2} = K_n R \quad (3.7)$$

$$L_{1,2} = ts/\sqrt{n} \quad (3.8)$$

Mez detekce, LOD (Limit of Detection)

Mez detekce je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou detekováno. IUPAC definuje mez detekce jako koncentraci analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu nulového vzorku [12].

Mez detekce byla vypočtena následovně. Nejmenší detekovatelná koncentrace prokainu byla změřena desetkrát po sobě. Z těchto hodnot byla vypočítána směrodatná odchylka, která byla podělena hodnotou směrnice kalibrační přímky, a výsledek byl vynásoben třemi.

Mez stanovitelnosti, LOQ (Limit of Quantification)

Mez stanovitelnosti je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou kvantitativně stanoveno s přijatelným stupněm přesnosti. Podle IUPAC je mez stanovitelnosti definována jako koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný desetinásobku směrodatné odchylky signálu nulového vzorku [12].

Mez stanovitelnosti byla vypočtena následovně. Nejmenší detekovatelná koncentrace prokainu byla změřena desetkrát po sobě. Z těchto hodnot byla vypočítána směrodatná odchylka, která byla podělena hodnotou směrnice kalibrační přímky, a výsledek byl vynásoben deseti.

4 Výsledky a diskuze

V následujících kapitolách budou uvedeny optimalizace a kalibrace měření a diskutovány výsledky měření.

4.1 Statické uspořádání

Byla ověřována platnost reakce [1] a stanovovány parametry měření.

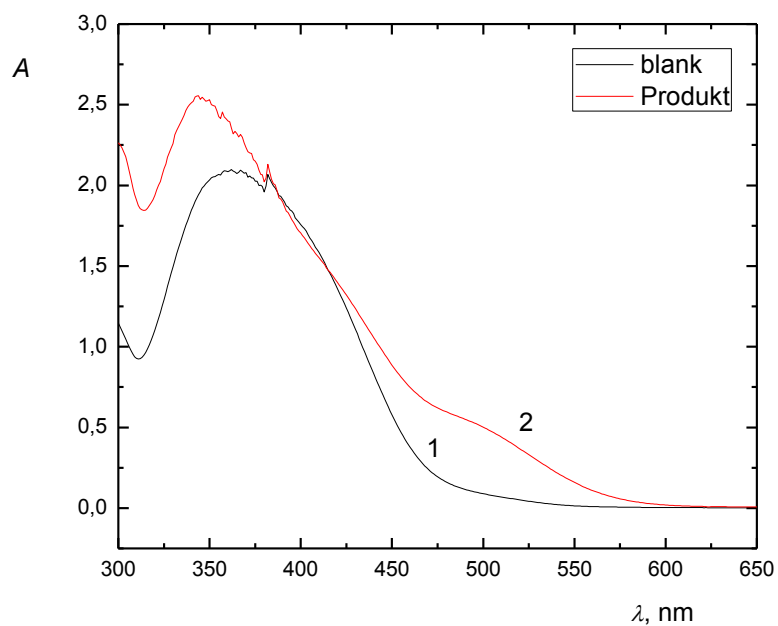
Pokud není uvedeno jinak, při všech statických experimentech byl vzorek připravován odměřením 2 ml prokainu o koncentraci 100 µg/ml, 1 ml kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové o koncentraci 2000 µg/ml, 2 ml 99,9 % ethanolu, 0,3 ml SDS o koncentraci 1000 µg/ml a byl doplněn po rysku v 10ml odměrné baňce acetátovým pufrům o pH 3,3. Výsledná koncentrace prokainu byla 20 µg/ml, kyseliny 1,2-naftochinon sulfonové byla 200 µg/ml, SDS byla 30 µg/ml a 20 obj. % ethanolu.

Signál byl nulován na vodu nebo na blank. Blank byl připravován tak, že místo 2 ml prokainu byly dávkovány 2 ml destilované vody.

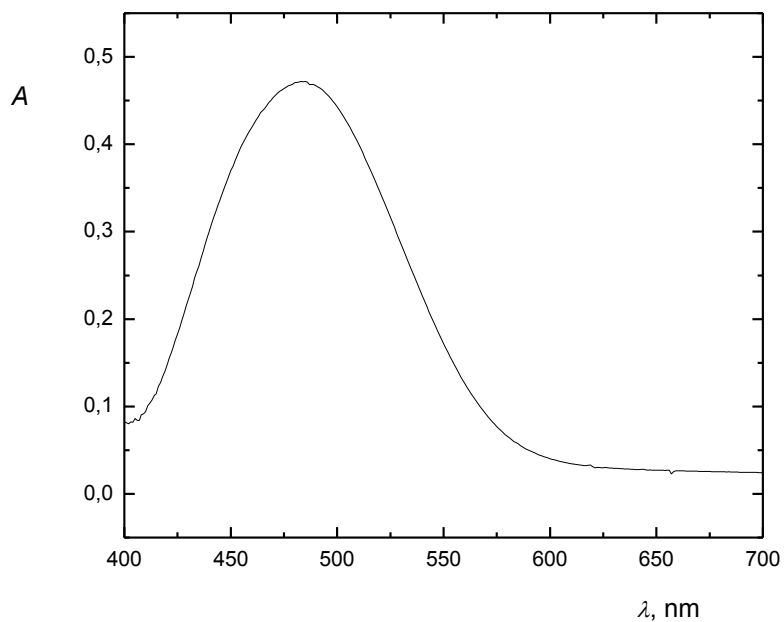
4.1.1 Proměření absorpčních spekter

Bylo proměřeno absorpční spektrum vzorku v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm. Vzorek i blank byly měřeny přesně 10 minut po smíchání reagentů, aby se roztok stihl vybarvit a aby byly dodrženy stejné experimentální podmínky. V prvním experimentu byly obě spektra (blank i vzorek) měřeny oproti destilované vodě. Na Obr. 4.1 je zobrazeno výsledné spektrum měřené v rozsahu vlnových délek od 300 do 650 nm. Křivka 1 zobrazuje absorpční spektrum blanku (o výše uvedeném složení) a křivka 2 zobrazuje změnu absorpčního spektra při přidavku prokainu o koncentraci 100 µg/ml k reakční směsi měřeno po 10 minutách. Z obou spekter je patrné, že k významné změně absorbance došlo při 484 nm. Velikost této změny byla dále využívána jako analytický signál, neboť její velikost byla úměrná koncentraci přidaného prokainu.

Dále bylo proměřeno spektrum vzorku od 200 do 800 nm, které bylo na rozdíl od předchozího experimentu měřeno oproti signálu blanku. Vzorek i blank byly měřeny přesně 10 minut po smíchání reagentů, aby se roztok stihl vybarvit. Na Obr. 4.2 je zobrazen rozsah vlnových délek od 400 do 700 nm. Při 484 nm vidíme výrazný pík produktu reakce kyseliny s prokainem (dále jen „Produkt“).



Obr. 4.1 UV-Vis absorpční spektra Produktu a blanku měřena proti destilované vodě
koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, kyveta měrné délky 1 cm, 1 – blank, 2 – Produkt

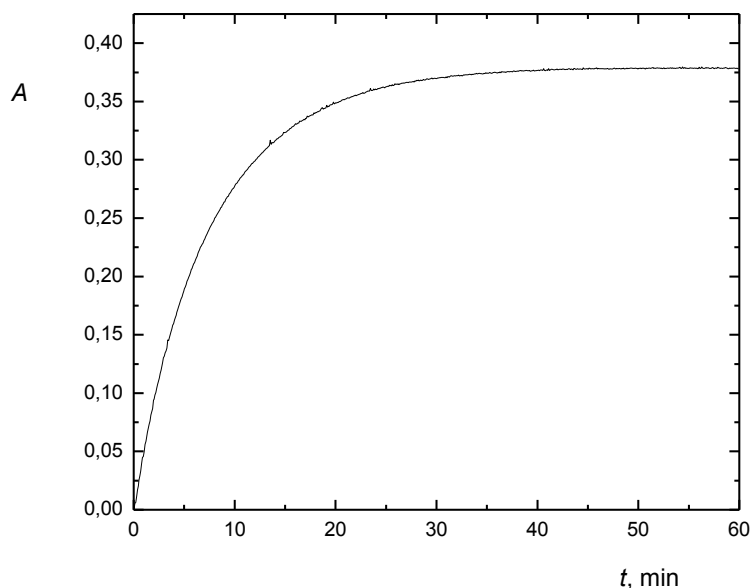


Obr. 4.2 Absorpční spektrum Produktu měřeno proti blanku
koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, kyveta měrné délky 1 cm

4.1.2 Rychlost vzniku Produktu

V dalším experimentu byla sledována rychlost reakce, při níž dochází ke vzniku výsledného Produktu a byl odhadnut optimální časový interval pro měření vzorků. Nejprve bylo ověřeno, zda absorbance samotného blanku nepodléhá změnám v předpokládaném časovém intervalu měření (cca během jedné hodiny). Absorbance blanku byla měřena v intervalech 30 s počínaje okamžikem smíchání reakčních složek po dobu jedenácti minut. Měření probíhalo při vlnové délce maxima Produktu, tedy při 484 nm. Absorbance byla měřena proti destilované vodě. V průběhu celého experimentu byl pozorován jen mírný nárůst absorbance z počáteční hodnoty 0,160 na hodnotu 0,200. Z toho tedy vyplývá, že toto navýšení je vzhledem k vysoké absorbanci Produktu zanedbatelné.

Dále byl optimalizován čas nutný k dostatečnému průběhu reakce mezi reakční směsí a prokainem. Byla připravena reakční směs a těsně před spuštěním experimentu byl do kyvety obsahující reakční směs pipetován prokain. Množství a koncentrace prokainu byla volena tak, aby bylo dosaženo finální koncentrace prokainu v kyvetě shodně s předchozími experimenty. Vzorkem bylo po dobu měření kontinuálně mícháno pomocí magnetického míchátko a každých 5 vteřin byla zaznamenána absorbance, a to po dobu jedné hodiny. Absorbance byla měřena proti destilované vodě. Výsledná závislost je uvedena na Obr. 4.3. V práci, z níž reakce vychází [1], je uvedeno, že k vybarvení roztoku postačí 10 minut. Z provedeného experimentu je patrné, že reakční směs je dostatečně vybarvena až po přibližně 30 minutách.



Obr. 4.3 Vybarvování reakční směsi

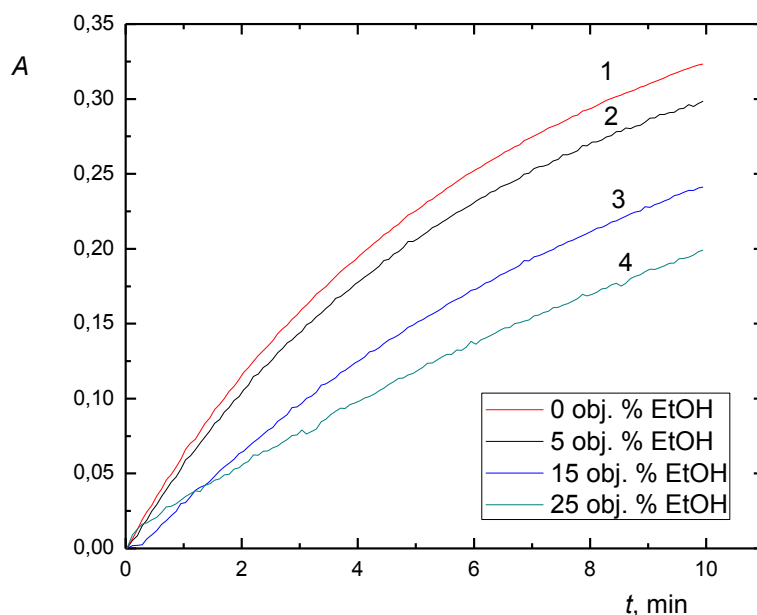
koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 200 \mu\text{g/ml}$, měřeno proti vodě, při $\lambda = 484 \text{ nm}$, kyveta měrné délky 1 cm

4.1.3 Vliv přídavku organického rozpouštědla

Autoři práce [1], z níž reakce vychází, poukazují na skutečnost, že přídavek organického rozpouštědla zvyšuje absorbanci reakční směsi. Autoři toto demonstrují na přídavku ethanolu. Pokud bude reakční směs obsahovat 20 obj. % ethanolu, zvýší se absorbance přibližně o 10 % oproti absorbanci roztoku bez přídavku ethanolu.

Následně bylo tedy zkoumáno, jestli tato skutečnost platí obecně a ověřena možnost zvýšení rychlosti probíhající chemické reakce mezi kyselinou a prokainem přídavkem organického rozpouštědla. Zvýšení rychlosti reakce by bylo možné pozorovat na křivce závislosti absorbance na čase jako její strmější nástup a také jako vyšší hodnoty absorbance v daném časovém intervalu ve srovnání s roztokem bez přídavku organického rozpouštědla.

Byla připravena sada reakčních směsí lišících se v koncentraci přidaného ethanolu. Měřeny byly koncentrace ethanolu 0,0; 5,0; 15 a 25 obj. %. Těsně před spuštěním experimentu byl do kyvety obsahující konkrétní reakční směs napipetován prokain, čímž došlo k zahájení reakce. Vzorkem bylo po dobu měření kontinuálně mícháno pomocí magnetického míchátka a každých 5 s byla zaznamenávána absorbance, a to po dobu deseti minut.



Obr. 4.4 Vliv přidavku organického rozpouštědla

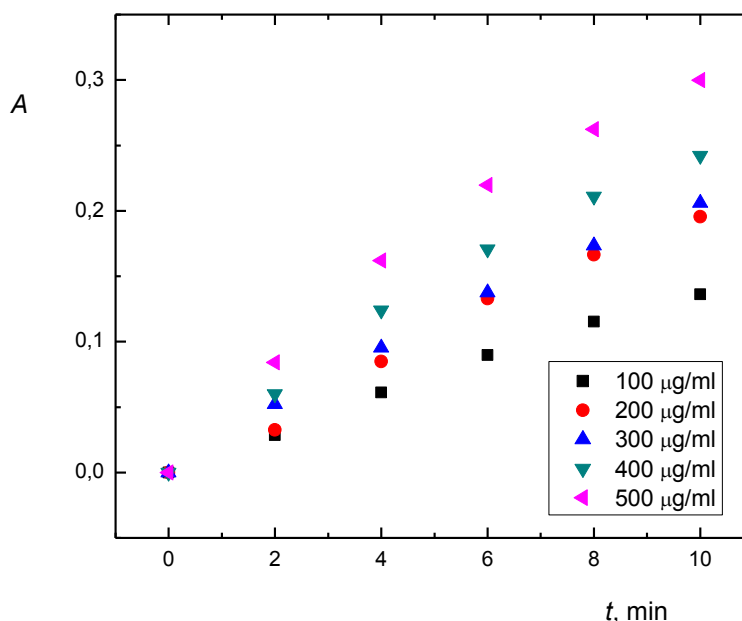
koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 200 \mu\text{g/ml}$, měřeno proti vodě, při $\lambda = 484 \text{ nm}$, kyveta měrné délky 1 cm, koncentrace přidávaného ethanolu $c_e = 0 \text{ obj. \%}$ (křivka 1), 5 obj. % (křivka 2), 15 obj. % (křivka 3) a 25 obj. % (křivka 4)

Z Obr. 4.4 je patrné, že se zvyšující se koncentrací organického rozpouštědla nedochází k rychlejšímu nástupu strmosti křivky. Jeho přidavek tedy nezrychluje rychlost reakce, ale, jak je patrné, naopak její rychlost snižuje, což se projeví ve snížení hodnoty absorbance. V dalších experimentech tedy již přidavek organického rozpouštědla byl vypuštěn.

4.1.4 Vliv koncentrace vybarvovacího činidla

Do reakční směsi bylo postupně přidáváno 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml kyseliny 1,2-naftochinon-4 sulfonové o koncentraci $2000 \mu\text{g/ml}$ a měření bylo prováděno po 0, 2, 4, 6, 8 a 10 minutách od smíchání reakčních činidel. Výsledná koncentrace kyseliny v reakční směsi byla 100, 200, 300, 400 a $500 \mu\text{g/ml}$.

Na Obr. 4.5 je demonstrováno, že s rostoucí koncentrací kyseliny 1,2-naftochinon-4 sulfonové roste i absorbance výsledného produktu reakce s prokainem.



Obr. 4.5 Vliv koncentrace vybarvovacího činidla

koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 100, 200, 300, 400$ a $500 \mu\text{g/ml}$, měřeno proti vodě, při $\lambda = 484 \text{ nm}$, kyveta měrné délky 1 cm

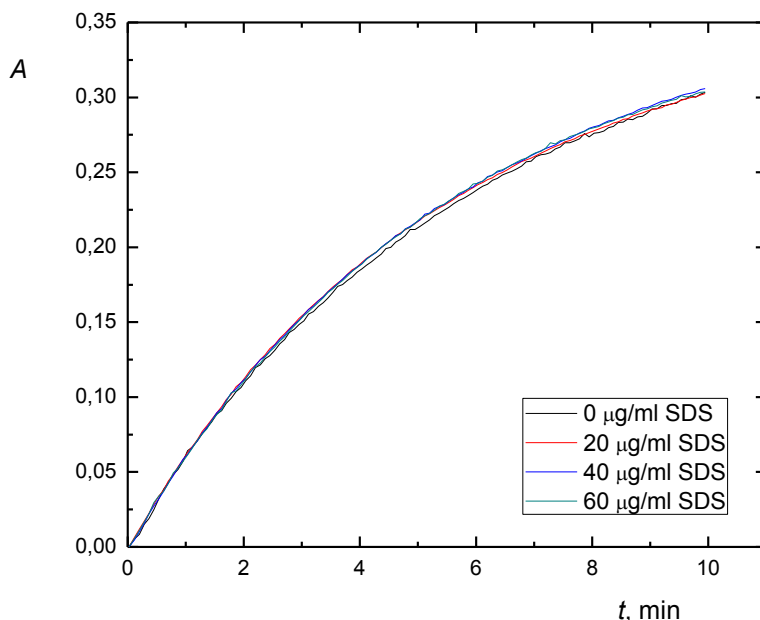
V čase t_0 je absorbance nulová, protože se ještě nestihl vytvořit produkt. S čím větším časovým odstupem po smíchání všech reagensů je měření prováděno, tím vyšší jsou hodnoty naměřené absorbance. Nejvýrazněji narůstá absorbance produktu při největším přídávku vybarvovacího činidla, tedy při jeho největší koncentraci v reakční směsi.

4.1.5 Vliv přídávku surfaktantu

Jako surfaktant byl použit sodium dodecyl sulfát, SDS. Podle práce [1] se tato sloučenina používá jako činidlo zvyšující citlivost spektrofotometrických měření. Bylo tedy dále zkoumáno, jestli se přírůstek SDS neprojevuje zvýšením rychlosti reakce, což by bylo možné pozorovat na křivce závislosti absorbance na čase jako její strmější nástup a také jako vyšší hodnoty absorbance v daném časovém intervalu.

Byla připravena sada reakčních směsí lišících se navzájem různou koncentrací SDS. Reakce byla zahájena pipetováním prokainu do kyvety obsahující konkrétní reakční směs. Vzorkem bylo po celou dobu měření kontinuálně mícháno pomocí magnetického míchátka a každých 5 s byla zaznamenávána absorbance, a to po dobu deseti minut. Měření byly následující koncentrace SDS: 0, 20, 40 a $60 \mu\text{g/ml}$.

Získané výsledky jsou patrné z Obr. 4.6. Je patrné, že se zvyšující se koncentrací SDS dochází pouze k velmi malému navýšení signálu (absorbance). Jeho přidavek tedy zvyšuje rychlost reakce jen nepatrně, a tudíž nebyl pro další experimenty aplikován.



Obr. 4.6 Vliv koncentrace SDS

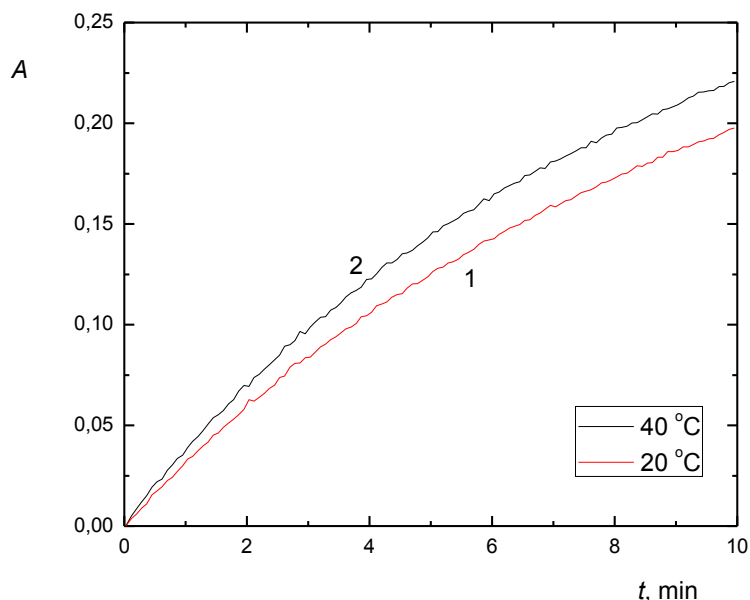
koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 200 \mu\text{g/ml}$, měřeno proti vodě, při $\lambda = 484 \text{ nm}$, kyveta měrné délky 1 cm, koncentrace přidávaného SDS $c_s = 0, 20, 40 \text{ a } 60 \mu\text{g/ml}$

4.1.6 Vliv teploty

V posledním experimentu ve statickém uspořádání byl zkoumán vliv teploty na rychlost probíhající chemické reakce mezi kyselinou a prokainem. Vzorek v kyvetě byl umístěn do termostátového kyvetového prostoru. Teplota kyvetového prostoru byla řízena teplotou protékající. Měření probíhalo při dvou teplotách, 20 a 40 °C.

Byly připraveny dvě reakční směsi. Reakce byla zahájena pipetováním prokainu do kyvety obsahující danou reakční směs. Vzorkem bylo po celou dobu měření kontinuálně mícháno pomocí magnetického míchátko a každých 5 s byla zaznamenávána absorbance, a to po dobu deseti minut.

Z Obr. 4.7 je patrné, že teplota nijak výrazně neovlivňuje hodnotu absorpance ani tvar křivek. Při vyšší teplotě došlo k mírnému navýšení absorpance, a to přibližně o 20 % hodnoty absorpance pro nižší teplotu. Vzhledem k energetické náročnosti provádění experimentu při vyšší teplotě bylo od tohoto kroku upuštěno.



Obr. 4.7 Vliv teploty reakční směsi

koncentrace prokainu $c_p = 20 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 200 \mu\text{g/ml}$, měřeno proti vodě, při $\lambda = 484 \text{ nm}$, kyveta měrné délky 1 cm, 1 – 20 °C, 2 – 40 °C

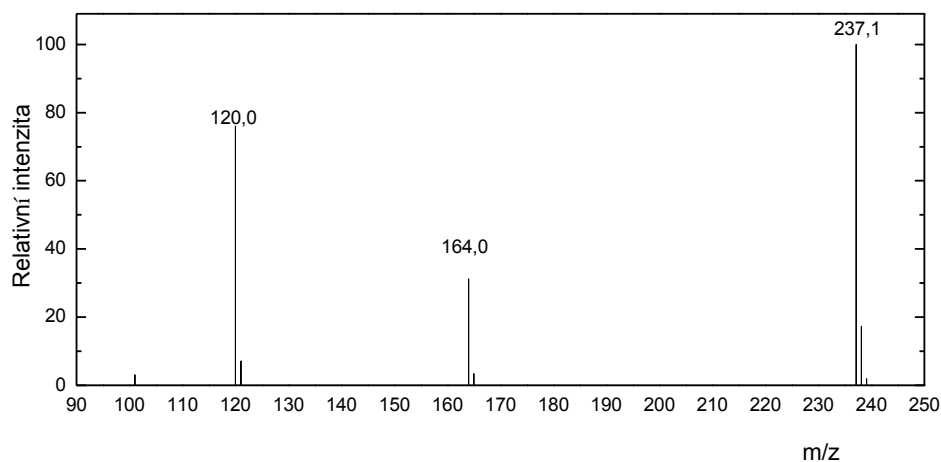
4.2 Měření pomocí hmotnostního spektrometru

Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjišťováno, zda reakcí prokainu s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou vzniká 2-(diethylamino)ethyl 4-[(3,4-dioxo-3,4-dihydronaftalen-1-yl) amino] benzoát (Produkt).

Bylo měřeno v rozmezí m/z 100 až 500, parametry iontového zdroje byly: teplota sušícího plynu 330 °C, průtok sušícího plynu 10 l/min, tlak nebulizéru 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V. Napětí na fragmentoru bylo nastaveno na 135 V. Vzorek o objemu 1 μl byl dávkován pomocí LC do průtoku mobilní fáze o složení 60 % H_2O , 40 % methanol.

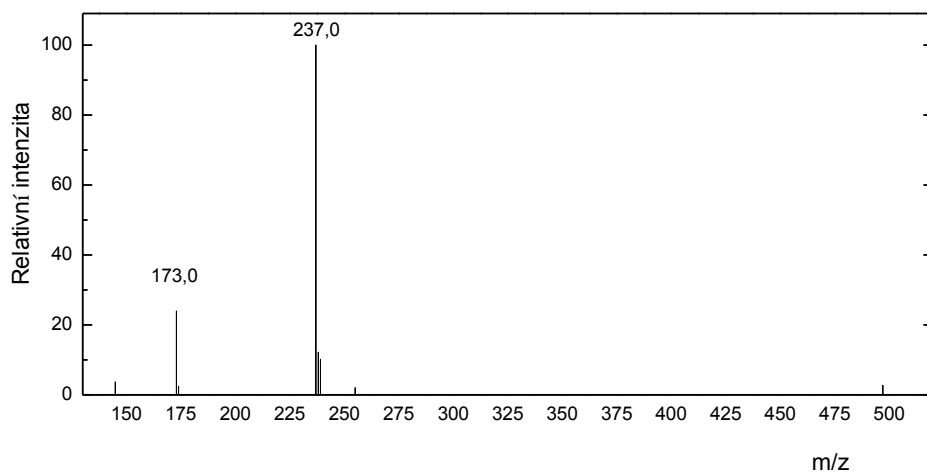
Všechna měření byla prováděná v pozitivním i negativním módu, dále uvedené jsou ale pouze ta, která poskytla informaci k identifikaci měřené látky. Bylo změřeno hmotnostní spektrum prokainu (ve formě hydrochloridu) o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové o koncentraci 400 $\mu\text{g/ml}$ a hmotnostní spektrum Produktu reakce.

Na Obr. 4.8 je zobrazeno hmotnostní spektrum prokainu ($M_r = 236,31$). Je zde patrný pík při m/z 237,1, což odpovídá protonizovanému prokainu.



Obr. 4.8 Hmotnostní spektrum prokainu – pozitivní mód

teplota sušícího plynu 330 °C, průtok sušícího plynu 10 l/min, tlak nebulizéru 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V, napětí na fragmentoru 135 V, objem vzorku 1 μ l, vzorek dávkován pomocí LC do průtoku mobilní fáze o složení 60 % H_2O , 40 % methanol

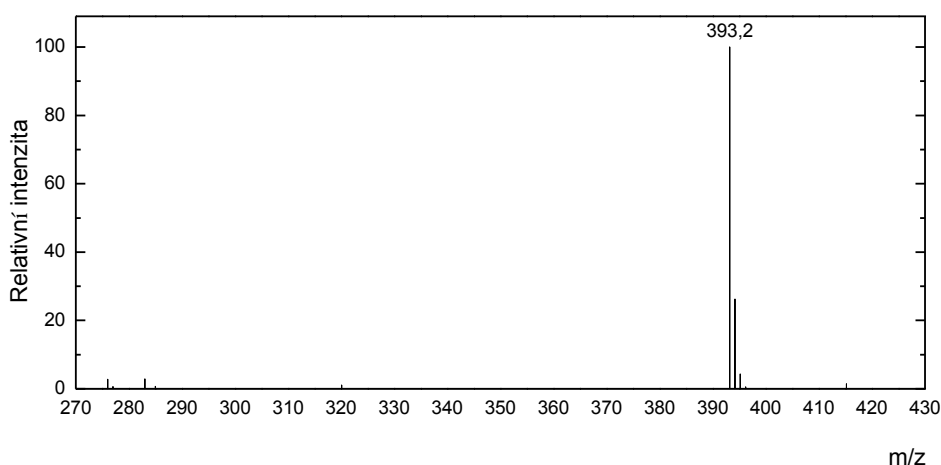


Obr. 4.9 Hmotnostní spektrum kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové – negativní mód

teplota sušícího plynu 330 °C, průtok sušícího plynu 10 l/min, tlak nebulizéru 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V, napětí na fragmentoru 135 V, objem vzorku 1 μ l, vzorek dávkován pomocí LC do průtoku mobilní fáze o složení 60 % H_2O , 40 % methanol

Na Obr. 4.9 je zobrazeno hmotnostní spektrum sodné soli kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové ($M_r = 260,2$). Je zde patrný pík při m/z 237,0, což odpovídá hmotnosti kyseliny po ztrátě jednoho sodíku.

Na Obr. 4.10 je zobrazeno hmotnostní spektrum předpokládaného produktu reakce ($M_r = 392,45$). Je zde patrný pík při m/z 393,2, což odpovídá protonizovanému předpokládanému produktu, tedy 2-(diethylamino)ethyl 4-[(3,4-dioxo-3,4-dihydronaftalen-1-yl) amino] benzoátu.



Obr. 4.10 Hmotnostní spektrum produktu – pozitivní mód

teplota sušícího plynu 330 °C, průtok sušícího plynu 10 l/min, tlak nebulizéru 40 psi, napětí na kapiláře 4000 V, napětí na fragmentoru 135 V, objem vzorku 1 μ l, vzorek dávkován pomocí LC do průtoku mobilní fáze o složení 60 % H_2O , 40 % methanol

Metodou hmotnostní spektrometrie byl potvrzen vzniku produktu reakce uváděný v publikaci, z níž tato práce vychází [1].

4.3 Průtokové injekční uspořádání

Před začátkem měření bylo ověřeno správné nastavení průtokové rychlosti peristaltické pumpy. Průtoková rychlost byla spočítána a porovnána s hodnotou nastavenou na displeji pumpy. Dále byly zkontrolovány hodnoty objemů připravených dávkovacích smyček/reakčních cívek. Ze znalosti průtokové rychlosti a ze změřeného času, za který projde bublinka příslušnou teflonovou hadičkou, byl dopočítán objem.

V reakční cívce může být zóna reakční směsi zadržena libovolně dlouhou dobu

zastavením nosného toku, tzv. technika stop-flow, z dôvodu dostatečného vybarvení prokainu. Doba potrebná pro kompletní transport prokainu z dávkovací smyčky do reakční smyčky byla změřena pomocí modrého barviva nadávkovaného do dávkovací smyčky. Výsledné časy jsou v Tab. 4.1. Je zřejmé, že pro různé objemy dávkovací smyčky jsou zapotřebí různé dlouhé časové intervaly.

Tab. 4.1 Čas potrebný k transportu prokainu z dávkovací smyčky

Objem dávkovací smyčky [μ l]	Čas potrebný k vymytí dávkovací smyčky [s]
500	80
250	40
200	35
150	30
100	25
80	23

Reakční směs byla následně transportována z reakční cívky do průtokové Z-cely, kde byla kontinuálně měřena absorbance protékajícího roztoku.

Při měření v uspořádání FIA byl jako nosný tok použit acetátový pufr, do něj byly dávkovány zóny analytu. Před reakční cívkou byl k tomuto toku připojen tok obsahující vybarvovací činidlo – kyselinu 1,2-naftochinon-4-sulfonovou. Měření probíhalo při vlnové délce 484 nm. Absorpční signál byl nulován na směs acetátového pufru a vybarvovacího činidla.

Optimalizovány byly následující parametry:

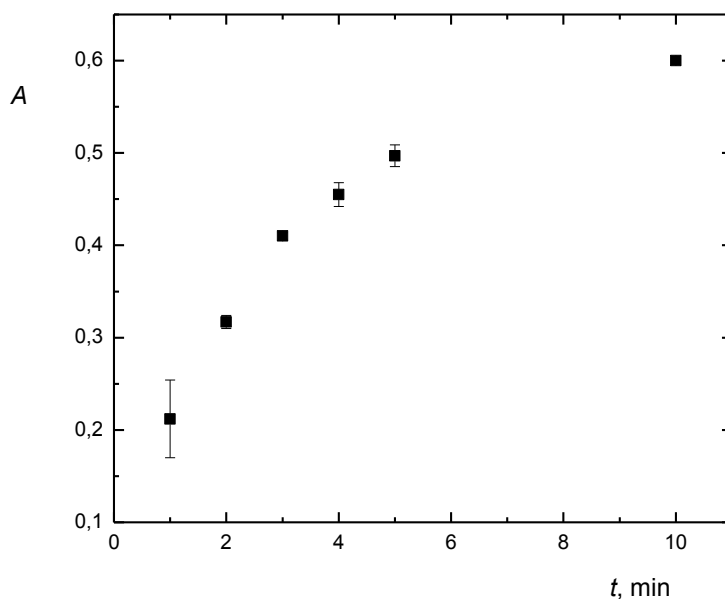
- doba zastavení toku – stop flow technika
- průtoková rychlost reakčních složek
- koncentrace vybarvovacího činidla
- objem dávkovací smyčky
- pH prostředí

Jednotlivé optimalizační experimenty byly vyhodnocovány na základě výšky dosaženého absorpčního signálu, který měl tvar píku. V některých případech byl vyhodnocován i tvar píku.

4.3.1 Optimalizace doby zastavení toku

Nejprve byl porovnáván signál získaný z měření bez zastavování toku, ale s dlouhou reakční cívkou, s měřením, kdy byl tok zastavován, a reakční cívka byla kratší. Bylo zjištěno, že zastavování toku je více flexibilní a uživatelsky jednodušší než vyměňování reakčních cívek, proto byla optimalizace prováděná pomocí zastavování toku. V tomto případě bylo pozorování i nižší rozmývání zóny produktu.

Při optimalizaci zastavování toku byla použita koncentrace prokainu 100 µg/ml, koncentrace kyseliny 400 µg/ml, objem dávkovací smyčky 250 µl, objem reakční cívky 500 µl. Průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{IN} = 0,5$ ml/min, průtoková rychlost, s jakou byl produkt transportován do průtokové cely byla $F_{OUT} = 0,5$ ml/min. Tok byl zastavován na 1, 2, 3, 4, 5 a 10 minut.



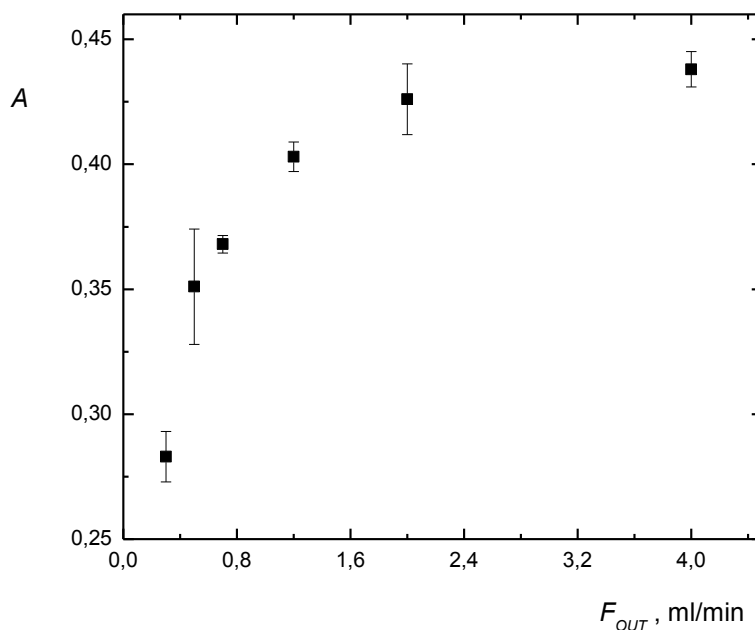
Obr. 4.11 Optimalizace doby zastavení toku

koncentrace prokainu $c_p = 100$ µg/ml, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400$ µg/ml, objem dávkovací smyčky $V_{DS} = 250$ µl, objem reakční cívky $V_{RC} = 500$ µl, průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{IN} = 0,5$ ml/min, průtoková rychlost, s jakou je produkt poslán do průtokové cely $F_{OUT} = 0,5$ ml/min, zastavení toku $t = 1, 2, 3, 4, 5$ a 10 min

Z grafu na Obr. 4.11 je patrné, že čím delší dobu je reakční směs zadržována v reakční cívce, tím vyšší je konverze analytu na produkt, což se projeví nárůstem absorpčního signálu. Z důvodu časové náročnosti byl jako optimální zvolen čas zastavení 5 minut.

4.3.2 Optimalizace průtokové rychlosti

Při optimalizaci průtokové rychlosti složek reakční směsi byla použita koncentrace prokainu 100 µg/ml, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové 400 µg/ml, zastavení toku na 5 min, objem dávkovací smyčky 250 µl, objem reakční cívky 500 µl. Průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla ve všech případech $F_{IN} = 0,5$ ml/min, průtoková rychlost transportu produktu do průtokové cely byla optimalizována a byly vyzkoušeny následující hodnoty: $F_{OUT} = 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 2,0$ a 4,0 ml/min.



Obr. 4.12 Optimalizace průtokové rychlosti

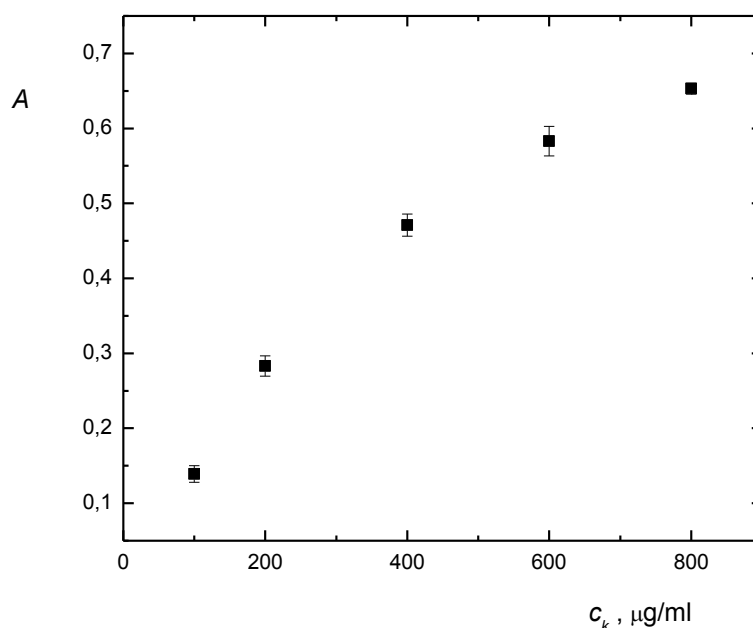
koncentrace prokainu $c_p = 100$ µg/ml, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400$ µg/ml, objem dávkovací smyčky $V_{DS} = 250$ µl, objem reakční cívky $V_{RC} = 500$ µl, zastavení toku $t = 5$ min, průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{IN} = 0,5$ ml/min, průtoková rychlost, s jakou je produkt poslán do průtokové cely $F_{OUT} = 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 2,0$ a 4,0 ml/min

Na Obr. 4.12 je patrné, že s rostoucí průtokovou rychlostí transportu reakční zóny do průtokové detekční cely roste velikost dosaženého signálu. Při nižších průtokových rychlostích byly získávány široké a nízké signály, v případě vysokých průtokových rychlostí tomu bylo naopak.

Při vyšších průtokových rychlostech docházelo častěji ke vzniku bublinek v trubičkách, a proto byla jako optimální zvolená průtoková rychlost 1,2 ml/min.

4.3.3 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

Při optimalizaci koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové (vybarvovacího činidla) byla použita koncentrace prokainu 100 $\mu\text{g/ml}$, zastavení toku na 5 min, objem dávkovací smyčky 500 μl , objem reakční cívky 500 μl . Průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla ve všech případech $F_{\text{IN}} = 0,5 \text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou byl produkt poslán do průtokové cely, byla $F_{\text{OUT}} = 1,2 \text{ ml/min}$. Koncentrace dávkaného vybarvovacího činidla byly 100, 200, 400, 600 a 800 $\mu\text{g/ml}$.



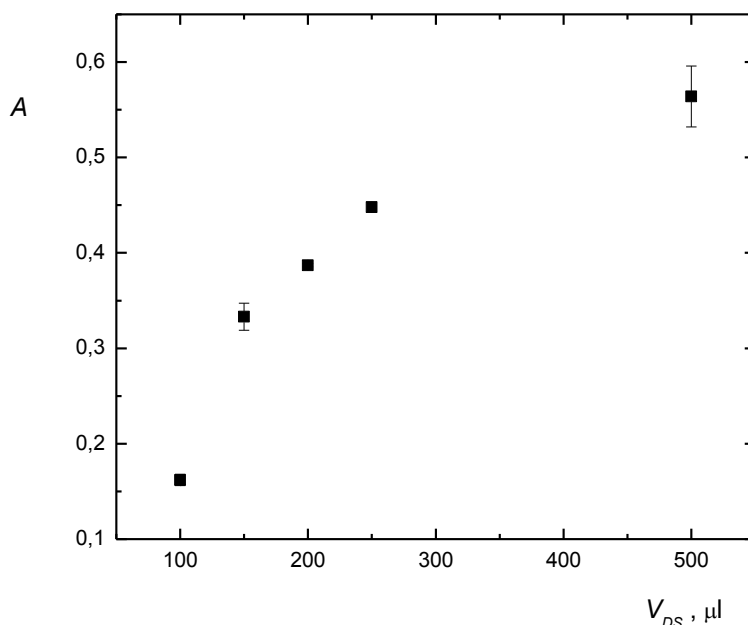
Obr. 4.13 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

koncentrace prokainu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 100, 200, 400, 600$ a $800 \mu\text{g/ml}$, objem dávkovací smyčky $V_{\text{DS}} = 500 \mu\text{l}$, objem reakční cívky $V_{\text{RC}} = 500 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{\text{IN}} = 0,5 \text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou je produkt poslán do průtokové cely $F_{\text{OUT}} = 1,2 \text{ ml/min}$

Na Obr. 4.13 je patrné, že s rostoucí koncentrací vybarvovacího činidla roste absorbance výsledného produktu. Vzhledem k tomu, že při všech experimentech byl signál nulován na danou koncentraci kyseliny, jsou na Obr. 4.13 znázorněny absorbance odpovídající vzniklému produktu. Jako kompromis mezi vysokým signálem ale velkou spotřebou vybarvovacího činidla byla zvolena jako optimum hodnota 400 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.4 Optimalizace objemu dávkovací smyčky

Dalším optimalizovaným parametrem byla velikost objemu dávkovací smyčky. Při tomto experimentu byla použita koncentrace prokainu $100\text{ }\mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $400\text{ }\mu\text{g/ml}$, zastavení toku na 5 min, objem reakční cívky $500\text{ }\mu\text{l}$. Průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla ve všech případech $F_{\text{IN}} = 0,5\text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou byl produkt posílán do průtokové cely, byla $F_{\text{OUT}} = 1,2\text{ ml/min}$. Objem dávkovací smyčky byl 100, 150, 200, 250 a $500\text{ }\mu\text{l}$.



Obr. 4.14 Optimalizace objemu dávkovací smyčky

koncentrace prokainu $c_p = 100\text{ }\mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400\text{ }\mu\text{g/ml}$, objem dávkovací smyčky $V_{\text{DS}} = 100, 150, 200, 250$ a $500\text{ }\mu\text{l}$, objem reakční cívky $V_{\text{RC}} = 500\text{ }\mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5\text{ min}$, průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{\text{IN}} = 0,5\text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou je produkt posílán do průtokové cely $F_{\text{OUT}} = 1,2\text{ ml/min}$

Na Obr. 4.14 vidíme, že se zvětšujícím se objemem dávkovací smyčky roste absorbance. Vysokých signálů je dosaženo pro objem reakční smyčky $500\text{ }\mu\text{l}$ a vyšších, když signál přestává mít tvar píku a plynule přechází do tvaru charakteristického pro kontinuální průtokovou analýzu. S rostoucím objemem dávkovací smyčky také narůstá čas potřebný k vymytí dávkovaného objemu z reakční cívky. Proto byla jako optimální zvolena hodnota $250\text{ }\mu\text{l}$ i za cenu mírného snížení citlivosti stanovení.

4.3.5 Vliv pH

Je známá závislost absorbance na pH roztoku prokainu s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou [1] a to v rozmezí pH od 1 do 11. Tato závislost byla ověřena v rozmezí pH 2,0 a 4,3, tedy přibližně \pm pH 1 od pH připraveného acetátového pufru. pH acetátového pufru bylo 3,3. Poté bylo pH pomocí kyseliny chlorovodíkové sníženo na pH 2,0 a byl změřen signál. Následně bylo pH pomocí hydroxidu draselného zvýšeno na pH 4,5 a byl změřen signál. Změřené hodnoty absorbance se významně nelišily, čím byly potvrzeny závěry publikované v práci [1].

4.3.6 Shrnutí optimálních podmínek

Optimální podmínky pro stanovení prokainu pomocí FIA jsou shrnuty v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 Shrnutí optimálních podmínek pro stanovení prokainu pomocí FIA

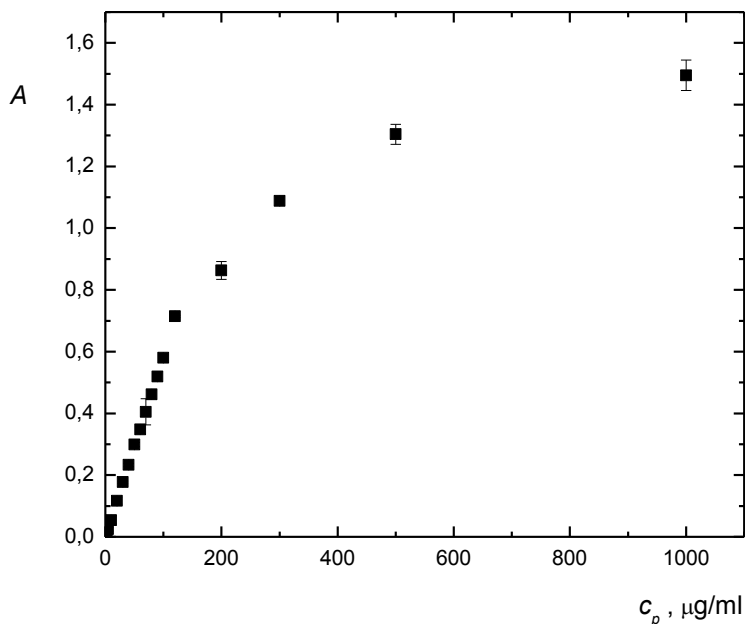
Optimalizovaný parametr	Optimální hodnota
Koncentrace vybarvovacího činidla [$\mu\text{g/ml}$]	400
Velikost dávkovací smyčky [μl]	250
Průtoková rychlost [ml/min]	1,2
Doba zastavení toku [min]	5

4.3.7 Kalibrační závislost v uspořádání FIA

Kalibrační měření probíhalo za podmínek, které byly v průběhu optimalizace vyhodnoceny jako optimální: koncentrace prokainu 100 $\mu\text{g/ml}$, objem dávkovací smyčky 250 μl , objem reakční cívky 500 μl . Průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla ve všech případech $F_{\text{IN}} = 0,5 \text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou byl produkt posílán do průtokové cely, byla $F_{\text{OUT}} = 1,2 \text{ ml/min}$, zastavení toku 5 minut.

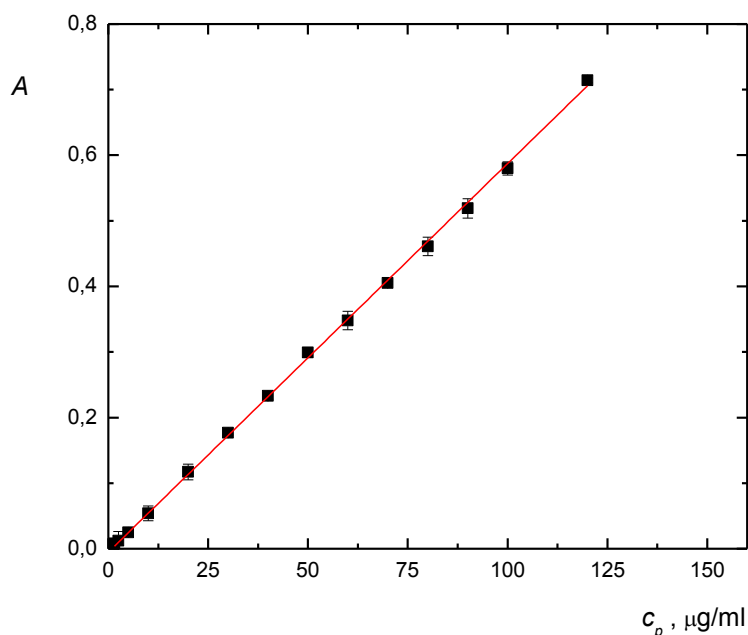
Průběh celé kalibrační křivky je zobrazen na grafu níže (Obr. 4.15), její lineární část pak na dalším grafu (Obr. 4.16).

Hodnota lineární regresní rovnice kalibrační přímky byla $y = 0,0059x - 0,0051$. Korelační koeficient měl hodnotu 0,9993. Odečtením směrnice kalibrační přímky byla určena citlivost metody $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ ml}/\mu\text{g}$.



Obr. 4.15 FIA kalibrační závislost prokainu

koncentrace prokainu $c_p = 1,5; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 200; 300; 500; 1000 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$,, objem dávkovací smyčky $V_{DS} = 250 \mu\text{l}$, objem reakční cívky $V_{RC} = 500 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost před vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{IN} = 0,5 \text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou je produkt posílán do průtokové cely $F_{OUT} = 1,2 \text{ ml/min}$



Obr. 4.16 FIA kalibrační závislost prokainu – lineární dynamický rozsah

koncentrace prokainu $c_p = 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120 \mu\text{g/ml}$,
koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem dávkovací smyčky
 $V_{DS} = 250 \mu\text{l}$, objem reakční cívky $V_{RC} = 500 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost před
vstupem reaktantů do reakční cívky byla $F_{IN} = 0,5 \text{ ml/min}$, průtoková rychlost, s jakou je produkt
poslán do průtokové cely $F_{OUT} = 1,2 \text{ ml/min}$

4.3.8 Charakteristiky FIA stanovení

Za zjištěných optimálních podmínek (Tab. 4.1) byla změřena opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti spektrofotometrického stanovení prokainu technikou FIA. Vyhodnocením signálů deseti po sobě následujících analýz roztoku prokainu o koncentraci $50 \mu\text{g/ml}$ byla získána hodnota opakovatelnosti metody ve formě relativní směrodatné odchylky $s_r = 1,58 \%$. Nejmenší detekovatelný signál odpovídal koncentraci prokainu $c_p = 1,5 \mu\text{g/ml}$, která byla změřena desetkrát po sobě. Postupem uvedeným v kapitole 3.5 byla vypočtena mez detekce, jejíž hodnota je $0,72 \mu\text{g/ml}$ a mez stanovitelnosti, jejíž hodnota je $2,40 \mu\text{g/ml}$.

Charakteristiky stanovení FIA jsou shrnuty v Tab. 4.3.

Tab. 4.3 Charakteristiky stanovení FIA

Charakteristiky stanovení	Hodnoty
LOD [$\mu\text{g/ml}$]	0,72
LOQ [$\mu\text{g/ml}$]	2,40
lineární dynamický rozsah [$\mu\text{g/ml}$]	2,5–120
pracovní rozsah [$\mu\text{g/ml}$]	2,5–500
opakovatelnost [%]	1,58
citlivost [$\text{ml}/\mu\text{g}$]	$5,9 \cdot 10^{-3}$
rovnice regrese	$y = 0,0059x - 0,0051$
korelační koeficient (R^2)	0,9993

4.3.9 Stanovení prokainu ve farmaceutických vzorcích pomocí FIA

Správnost optimalizované techniky FIA byla ověřena na stanovení koncentrace prokainu v injekčních roztocích prokain hydrochloridu s obsahem analytu 0,2 % a 0,5 %. Stanovení koncentrace prokainu v reálných vzorcích bylo provedeno pomocí metody standardního přídatku a metody jednoho standardu.

Metodou jednoho standardu byla koncentrace prokainu stanovena pomocí rovnice 4.1,

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot c_{st} \quad (4.1)$$

kde c_{vz} je koncentrace vzorku, c_{st} koncentrace standardu, A_{vz} absorbance vzorku a A_{st} absorbance standardu. 0,2% roztok prokainu byl naředěn na předpokládanou koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, 0,5% roztok prokainu byl naředěn na předpokládanou koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace standardu byla 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Byla změřena absorbance vzorků i standardů a hodnoty vypočtené koncentrace byly podrobeny statistickému vyhodnocení.

V 0,2% injekčním roztoku bylo stanoveno $0,18 \pm 0,04$ % prokain hydrochloridu ($s_r = 3,28$ %). V 0,5% injekčním roztoku bylo nalezeno $0,59 \pm 0,09$ %, ($s_r = 4,06$ %) prokain hydrochloridu.

Stanovení metodou standardního přídávku bylo realizováno pomocí čtyři roztoků lišících se koncentrací standardního přídávku. 0,2% injekční roztok byl naředěn na přibližnou koncentraci 20 µg/ml, 0,5% injekční roztok byl naředěn na přibližnou koncentraci 50 µg/ml. Celkové koncentrace připravených kalibračních roztoků prokainu a koncentrace přídávků vzorku prokainu jsou uvedeny v Tab. 4.4. Do grafu byly vyneseny hodnoty absorbance proti koncentraci přídávků standardu. Z rovnice regrese kalibrační přímky pak byla vypočtena koncentrace prokainu ve vzorku a její hodnoty byly podrobeny statistickému vyhodnocení.

Tab. 4.4 Koncentrace kalibračních roztoků

0,2% injekční roztok		0,5% injekční roztok	
předpokládaná c prokainu [µg/ml]	c přídávku standardu [µg/ml]	předpokládaná c prokainu [µg/ml]	c přídávku standardu [µg/ml]
20	0	50	0
45	25	75	25
70	50	100	50
120	100	125	100

Při celkové koncentraci prokainu 125 µg/ml došlo k zakřivení kalibrační křivky (lineární dynamický rozsah je do 120 µg/ml), a proto byla koncentrace prokainu zjišťována pouze ze tří předchozích kalibračních bodů.

V 0,2% injekčním roztoku bylo stanoveno $0,21 \pm 0,04$ % prokain hydrochloridu ($s_r = 3,34$ %). V 0,5% injekčním roztoku bylo nalezeno $0,54 \pm 0,02$ %, ($s_r = 1,74$ %) prokain hydrochloridu.

4.4 Sekvenční injekční uspořádání

Při měření v uspořádání SIA byla jako nosný tok použita destilovaná voda, jako vybarvovací činidlo kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, která byla ředěna acetátovým pufrem na příslušnou koncentraci. Měření bylo prováděno při vlnové délce 484 nm. Nejprve byl vždy změřen blank a jeho signál byl pak od signálu analytu odečítán.

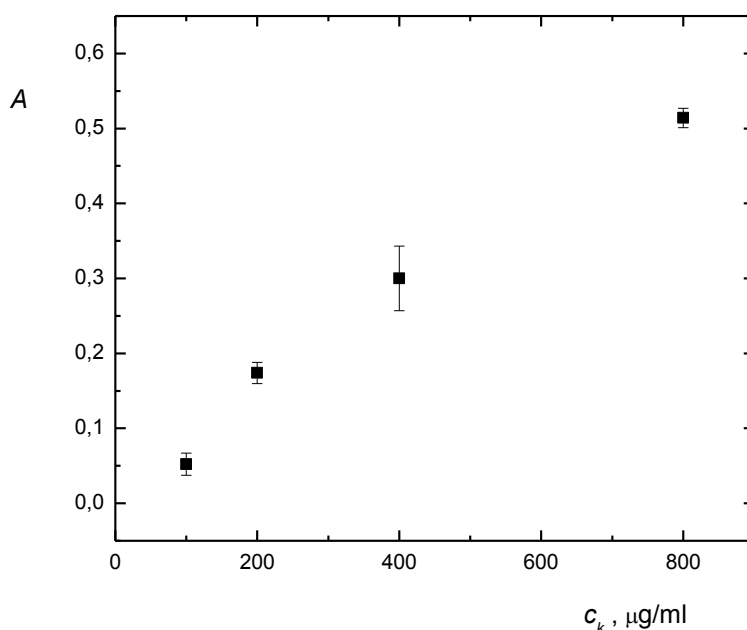
U uspořádání SIA byly optimalizovány následující parametry:

- koncentrace vybarvovacího činidla
- objemy reakčních zón
- průtoková rychlost reakční zóny detektorem
- časová závislost vzniku Produktu

Výsledky jednotlivých optimalizací byly vyhodnocovány na základě výšky píku a jeho tvaru.

4.4.1 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

Při optimalizaci koncentrace vybarvovacího činidla – kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové, byla použita průtoková rychlost 1,5 ml/min, zastavení toku na 5 min, objem reakčních zón 150 μ l. Koncentrace prokainu byla 100 μ g/ml. Kyselina byla ředěna acetátovým pufrům na koncentrace 800, 400, 200, 100 μ g/ml.



Obr. 4.17 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

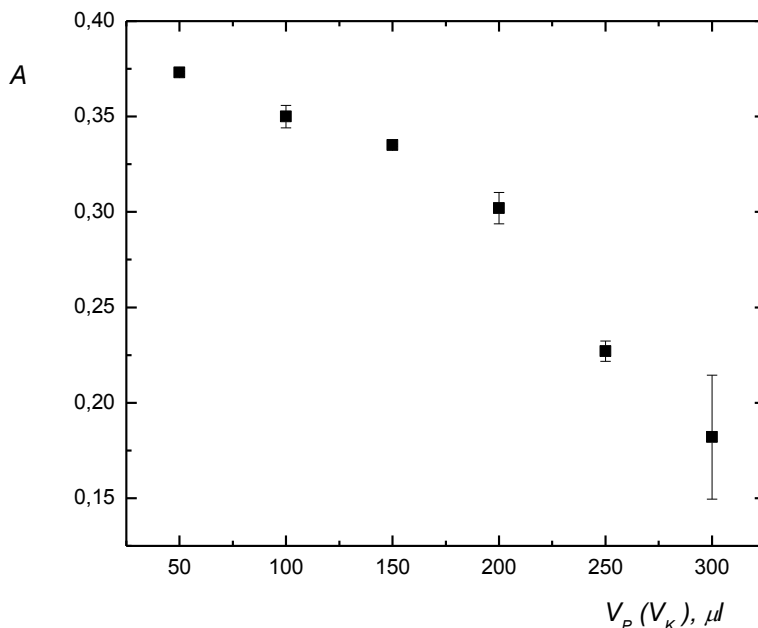
koncentrace prokainu $c_p = 100$ μ g/ml, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 100, 200, 400$ a 800 μ g/ml, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_K i prokainu $V_P = 150$ μ l, zastavení toku $t = 5$ min, průtoková rychlost $F = 1,5$ ml/min

Na grafu (Obr. 4.17) je vidět, že s rostoucí koncentrací kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové se zvyšuje signál. Tvar píků je u všech koncentrací stejný. Z důvodu vysoké spotřeby kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové pro koncentraci 800 $\mu\text{g/ml}$ byla jako optimální zvolena koncentrace 400 $\mu\text{g/ml}$. Dalším důvodem byl příliš vysoký signál blanku při koncentraci kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové 800 $\mu\text{g/ml}$.

4.4.2 Optimalizace objemů reakčních zón

Na rozdíl od uspořádání FIA bylo nutné v uspořádání SIA optimalizovat jak objem dávkované zóny roztoku vzorku obsahující analyt, tak i objem zóny vybarvovacího činidla. Jako vybarvovací činidlo byla použita kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová o dané koncentraci v acetátovém pufru. Byla použita průtoková rychlost 1,5 ml/min, zastavení toku na 5 min, koncentrace prokainu byla 100 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové 400 $\mu\text{g/ml}$.

Nejprve byl zvolen stejný objem obou zón a to v poměru 1:1 při různých objemech (uváděno v μl): 300, 250, 200, 150, 100 a 50 μl .

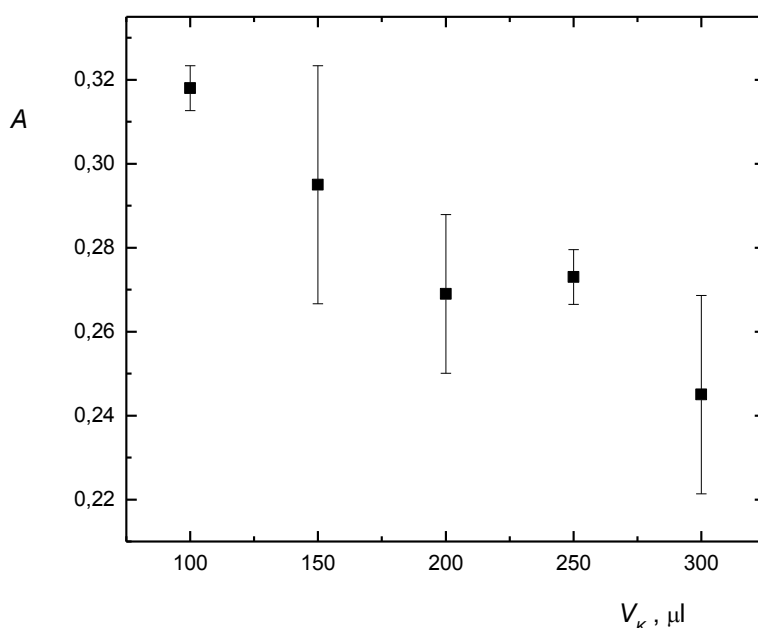


Obr. 4.18 Optimalizace objemu reakčních zón – zóny ve stejném poměru

koncentrace prokainu hydrochloridu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_K i prokainu $V_P = 300, 250, 200, 150, 100$ a $50 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost $F = 1,5 \text{ ml/min}$

Z grafu (Obr. 4.18) je patrné, že s rostoucím objemem reakčních zón mírně klesá signál. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro objemy reakčních zón 50 a 50 μl . Jako optimální hodnota byla však zvolena hodnota pro obě zóny 150 μl , protože píky při nižších objemech poskytovaly nesymetrické signály.

Dále byl volen fixní objem jedné reakční zóny a druhý byl měněn. Při fixní hodnotě dávkovaného objemu prokainu 150 $\mu\text{g/ml}$ byly měřeny následující poměry: 300:150, 250:150, 200:150, 150:150 a 100:150 (objem vybarvovacího činidla:objem prokainu).

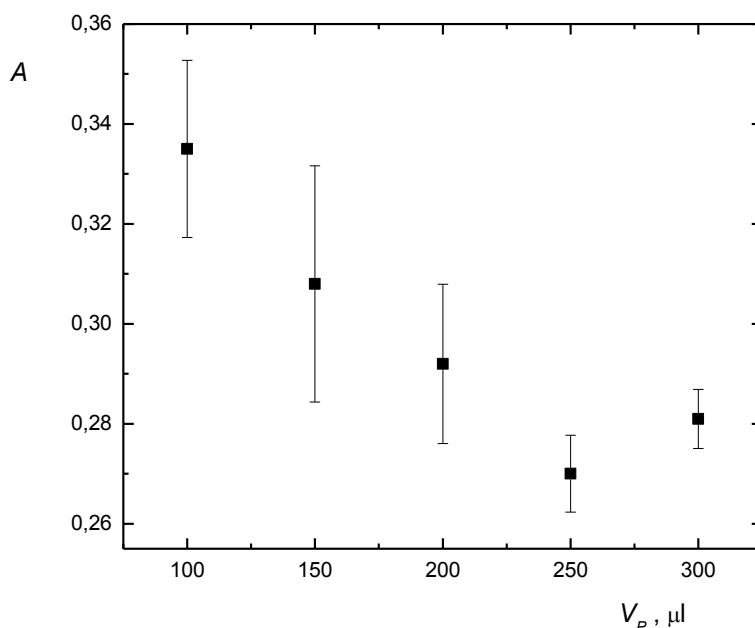


Obr. 4.19 Optimalizace objemu reakčních zón – fixní objem prokainu

koncentrace prokainu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny prokainu $V_p = 150 \mu\text{l}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $V_K = 300, 250, 200, 150, 100$ a $50 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost $F = 1,5 \text{ ml/min}$

Z grafu (Obr. 4.19) vyplývá, že s rostoucím objemem reakčních zón mírně klesá signál.

Při fixní hodnotě kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové 150 $\mu\text{g/ml}$ byly měřeny následující poměry: 300:150, 250:150, 200:150, 150:150 a 100:150 (objem prokainu:objem vybarvovacího činidla).



Obr. 4.20 Optimalizace objemu reakčních zón – fixní objem kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové
koncentrace prokainu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové
 $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $V_K = 150 \mu\text{l}$, objem
nadávkované zóny prokainu $V_p = 300, 250, 200, 150, 100$ a $50 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$,
průtoková rychlost $F = 1,5 \text{ ml/min}$

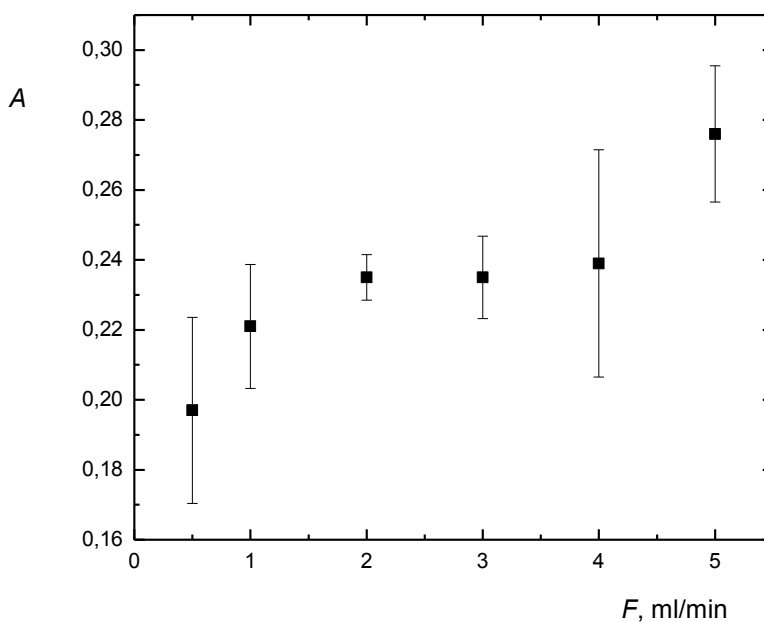
Z grafu (Obr. 4.20) vyplývá, že s rostoucím objemem reakčních zón mírně klesá signál.

Při porovnání těchto tří grafů (Obr. 4.18, 4.19 a 4.20) vidíme, že na signál nemá velký vliv, jestli jsou zóny činidla a vzorku stejně nebo různě velké. Vyšší signály jsou poskytovány, pokud jsou použity menší objemy.

4.4.3 Optimalizace průtokové rychlosti

Po optimalizaci objemů reakčních činidel byla pozornost zaměřena na optimalizaci průtokové rychlosti produktu reakce detekční celou. Byla použita koncentrace prokainu $100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny (ředěné acetátovým pufrům) $400 \mu\text{g/ml}$, zastavení toku na 5 min , objem reakčních zón $150 \mu\text{l}$.

Průtoková rychlost, tedy rychlost, jakou je reakční směs transportována z reakční cívky do průtokové cely, byla nastavena na $0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0$ a $5,0 \text{ ml/min}$.



Obr. 4.21 Optimalizace průtokové rychlosti

koncentrace prokainu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_K i prokainu $V_P = 150 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost $F = 0,5; 1; 2; 3; 4$ a 5 ml/min

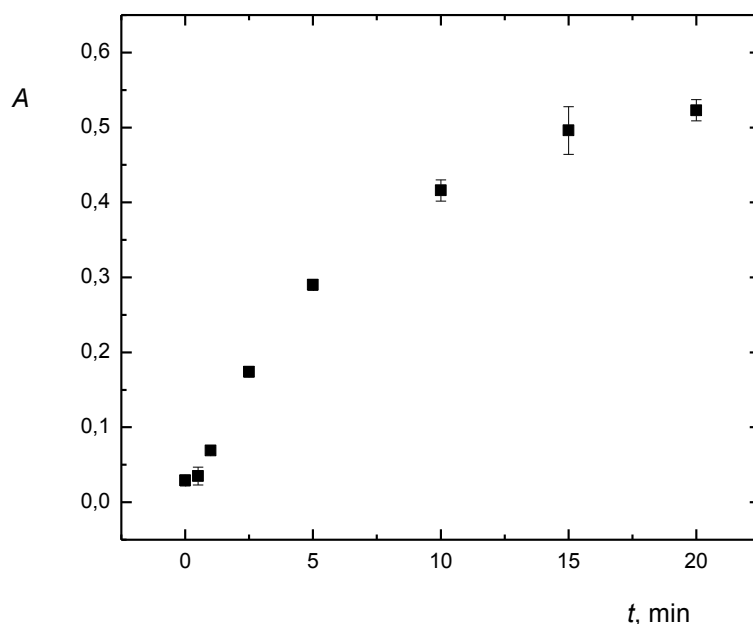
Na grafu (Obr. 4.21) vidíme, že se zvyšující se průtokovou rychlostí roste výška signálu. Zároveň se podle očekávání šířka píků zmenšuje a signály jsou méně rozmyté. Proto je vhodná vyšší průtoková rychlost. Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost 5 ml/min .

4.4.4 Optimalizace časové závislosti vzniku Produktu

Při optimalizaci doby zastavení toku byla použita koncentrace prokainu $100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny (ředěné acetátovým puforem) $400 \mu\text{g/ml}$, průtoková rychlost $1,5 \text{ ml/min}$ a objem reakčních zón $150 \mu\text{l}$.

Tok byl zastavován na 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15 a 20 minut.

Při měření blanku byl tok zastavován vždy na 5 s, protože absorbance blanku se s časem výrazně nemění (viz kapitola 4.1.2).



Obr. 4.22 Optimalizace časové závislosti

koncentrace prokainu $c_p = 100 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_k i prokainu $V_p = 150 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15$ a 20 min, průtoková rychlost $F = 1,5 \text{ ml/min}$

Z grafu (Obr. 4.22) je patrné, že s rostoucí dobou, po kterou je tok zastaven, roste i velikost signálu. Je patrné, výška signálů při patnácté a dvacáté minutě se již výrazně neliší. S ohledem na časovou náročnost měření byl jako optimální zvolen čas 5 minut.

4.4.5 Shrnutí optimálních podmínek

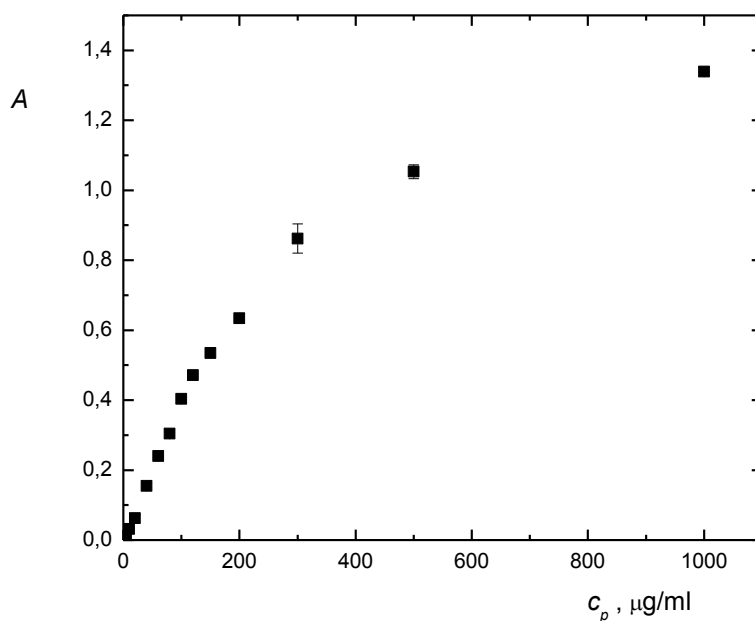
Optimální podmínky pro stanovení prokainu pomocí techniky SIA jsou shrnuty v Tab. 4.5.

Tab. 4.5 Shrnutí optimálních podmínek pro stanovení prokainu pomocí SIA

Optimalizovaný parametr	Optimální hodnota
Koncentrace vybarvovacího činidla [$\mu\text{g/ml}$]	400
Objemy reakčních zón [μl]	150
Průtoková rychlost [ml/min]	5
Doba zastavení toku [min]	5

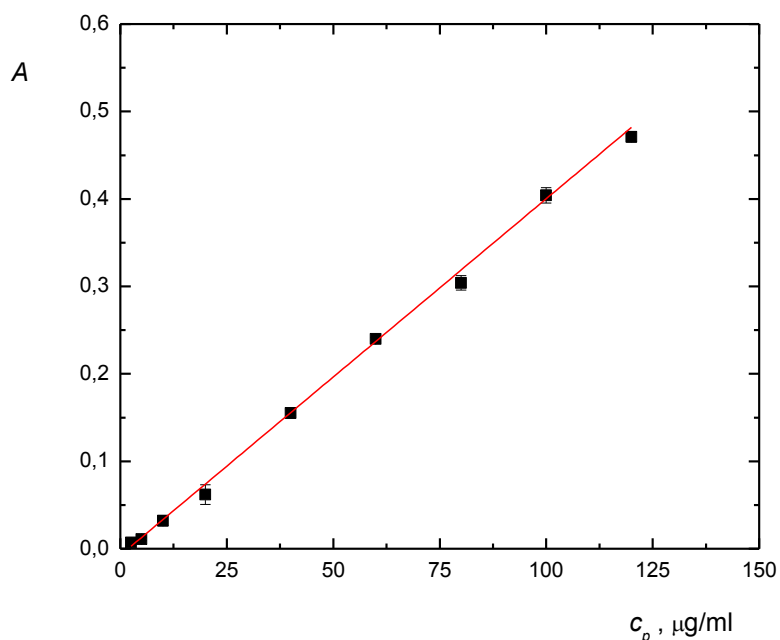
4.4.6 Kalibrační závislost v uspořádání SIA

Kalibrační měření probíhalo za podmínek, které byly v průběhu optimalizace vyhodnoceny jako nejvíc vyhovující: koncentrace kyseliny (ředěné acetátovým pufrům) 400 $\mu\text{g/ml}$, průtoková rychlost 5 ml/min, objem reakčních zón 150 μl a zastavení toku na 5 minut. Průběh celé kalibrační křivky je zobrazen na grafu (Obr. 4.23), její lineární část pak na dalším grafu (Obr. 4.24).



Obr. 4.23 SIA kalibrační závislost prokainu

koncentrace prokainu $c_p = 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 150; 200; 300; 500; 1000 \mu\text{g/ml}$, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400 \mu\text{g/ml}$, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_K i prokainu $V_P = 150 \mu\text{l}$, zastavení toku $t = 5 \text{ min}$, průtoková rychlost $F = 5 \text{ ml/min}$



Obr. 4.24 SIA kalibrační závislost prokainu – lineární dynamický rozsah

koncentrace prokainu $c_p = 2,5; 5,0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120$ µg/ml, koncentrace kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové $c_k = 400$ µg/ml, objem nadávkované zóny kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové V_K i prokainu $V_P = 150$ µl, zastavení toku $t = 5$ min, průtoková rychlost $F = 5$ ml/min

Hodnota lineární regresní rovnice kalibrační přímky byla $y = 0,0041x - 0,0074$. Korelační koeficient měl hodnotu 0,9990. Odečtením směrnice kalibrační přímky byla určena citlivost metody $4,1 \cdot 10^{-3}$ ml/µg.

4.4.7 Charakteristiky SIA stanovení

Za nastavení optimálních podmínek (Tab. 4.4) byla proměřena opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti spektrofotometrického stanovení prokainu technikou SIA. Vyhodnocením signálů deseti po sobě následujících analýz roztoku prokainu o koncentraci 100 µg/ml byla získána hodnota opakovatelnosti metody ve formě relativní směrodatné odchylky $s_r = 2,74$ %. Nejmenší detekovatelný signál odpovídal koncentraci prokainu $c_p = 2,5$ µg/ml, která byla změřena desetkrát po sobě. Postupem uvedeným v kapitole 3.5 byla vypočtena mez detekce, jejíž hodnota je 0,68 µg/ml a mez stanovitelnosti, jejíž hodnota je 2,25 µg/ml.

Charakteristiky stanovení SIA jsou shrnuty v Tab. 4.6.

Tab. 4.6 Charakteristiky stanovení SIA

Charakteristiky stanovení	Hodnoty
LOD [$\mu\text{g/ml}$]	0,68
LOQ [$\mu\text{g/ml}$]	2,25
lineární dynamický rozsah [$\mu\text{g/ml}$]	2,5–120
pracovní rozsah [$\mu\text{g/ml}$]	2,5–500
opakovatelnost [%]	2,74
citlivost [$\text{ml}/\mu\text{g}$]	$4,98 \cdot 10^{-3}$
rovnice regrese	$y = 0,0041x - 0,0073$
korelační koeficient (R^2)	0,9990

4.4.8 Stanovení prokainu ve farmaceutických vzorcích pomocí SIA

Optimalizovanou technikou FIA byla stanovena koncentrace prokainu v injekčním roztoku prokain hydrochloridu 0,2% a 0,5 % (Ardeapharma) pomocí metody standardního přídávku a metody jednoho standardu.

Metodou jednoho standardu byla koncentrace prokainu stanovena pomocí rovnice 4.1. 0,2% roztok prokainu byl naředěn na přibližnou koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, 0,5% roztok prokainu byl naředěn na přibližnou koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace standardu byla 20 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Byla změřena absorbance vzorků i standardů a hodnoty vypočtené koncentrace byly podrobeny statistickému vyhodnocení.

V 0,2% injekčním roztoku bylo stanoveno $0,18 \pm 0,02$ % prokain hydrochloridu ($s_r = 3,08$ %). V 0,5% injekčním roztoku bylo nalezeno $0,54 \pm 0,03$ % ($s_r = 2,38$ %) prokain hydrochloridu.

Stanovení metodou standardního přídávku bylo realizováno čtyřmi kalibračními body. 0,2% injekční roztok byl naředěn na přibližnou koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, 0,5% injekční roztok byl naředěn na přibližnou koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Celkové koncentrace připravených kalibračních roztoků prokainu a koncentrace přídávků vzorku prokainu jsou uvedeny v Tab. 4.7. Do grafu byly vyneseny hodnoty absorbance proti koncentraci přídávků standardu. Z rovnice regrese kalibrační přímky pak byla vypočtena koncentrace prokainu ve vzorku její hodnoty byly podrobeny statistickému vyhodnocení.

Tab. 4.7 Koncentrace kalibračních roztoků

0,2% injekční roztok		0,5% injekční roztok	
celková <i>c</i> prokainu [μg/ml]	<i>c</i> přídavku standardu [μg/ml]	celková <i>c</i> prokainu [μg/ml]	<i>c</i> přídavku standardu [μg/ml]
40	0	50	0
50	10	75	25
60	20	100	50
80	40	125	100

V 0,2% injekčním roztoku bylo stanoveno $0,18 \pm 0,02$ % prokain hydrochloridu ($s_r = 2,52$ %). V 0,5% injekčním roztoku bylo nalezeno $0,51 \pm 0,09$ %, ($s_r = 4,07$ %).

4.5 Porovnání FIA a SIA uspořádání

Byla provedena optimalizace stanovení prokainu v uspořádání FIA a SIA se spektrofotometrickou detekcí. Zjištěné základní charakteristiky pro obě metody jsou shrnuty v Tab. 4.8.

Tab. 4.8 Porovnání základních charakteristik FIA a SIA

Parametr	FIA	SIA
LOD [μg/ml]	0,72	0,68
LOQ [μg/ml]	2,40	2,25
lineární dynamický rozsah [μg/ml]	2,5 - 120	2,5 - 120
pracovní rozsah [μg/ml]	2,5 - 500	2,5 - 500
opakovatelnost [%]	1,58	2,74
citlivost [ml/μg]	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$4,98 \cdot 10^{-3}$
korelační koeficient (R^2)	0,9993	0,9990

Pomocí SIA techniky se spektrofotometrickou detekcí je možné dosáhnout nižší meze detekce i meze stanovitelnosti prokainu. Na druhou stranu uspořádání FIA je mírně citlivější a také hodnoty pro opakovatelnost jsou nižší. Lineární dynamický rozsah je pro obě metody stejný, stejně tak je prakticky stejná i hodnota korelačního koeficientu.

Injekční roztoky prokain hydrochloridu o koncentraci 0,2% a 0,5% byly spektrofotometricky stanoveny pomocí FIA a SIA. Naměřené hodnoty absorbance byly přepočítány na koncentrace. Výsledné hodnoty pro obě metody shrnuje Tab. 4.9.

Tab. 4.9 Porovnání stanovení prokainu ve farmaceutických vzorcích (Vzorek) pomocí metody standardního přídatku (ST PŘ) a metody jednoho standardu (1 ST) technikou FIA a SIA

Vzorek	Metoda	FIA	SIA
0,2 %	1 ST	$0,18 \pm 0,04 \%$ ($s_r = 3,28 \%$)	$0,18 \pm 0,02 \%$ ($s_r = 3,08 \%$)
0,2 %	ST PŘ	$0,21 \pm 0,04 \%$ ($s_r = 3,34 \%$)	$0,18 \pm 0,02 \%$ ($s_r = 2,52 \%$)
0,5 %	1 ST	$0,59 \pm 0,09 \%$, ($s_r = 4,06 \%$)	$0,54 \pm 0,03 \%$ ($s_r = 2,38 \%$)
0,5 %	ST PŘ	$0,54 \pm 0,02 \%$ ($s_r = 1,74 \%$)	$0,51 \pm 0,09 \%$ ($s_r = 4,07 \%$)

Shoda naměřených výsledků v porovnání s deklarovaným obsahem prokainu v reálných farmaceutických přípravcích je ve všech případech relativně dobrá. Největší odchylky od deklarované hodnoty byly zjištěny v případě FIA techniky s použitím jednoho standardu, kdy zjištěná odchylka činila 18 %. V ostatních případech se podařilo získat výsledky s odchylkou do 8 %.

Z výsledků uvedených v Tab. 4.9 vyplývá, že pro analýzu reálných vzorků farmaceutických přípravků injekčního roztoku prokain hydrochloridu (kontrola obsahu účinné látky) by bylo vhodné použít SIA techniku. SIA je v podstatě celá ovládaná počítačem, což má z uživatelského hlediska výhody, jako je eliminace rizika lidské chyby (při dávkování, zastavování toku,...) a zároveň nižší časová náročnost na přítomnost uživatele při procesu měření. Dále je i velmi důležitá minimální spotřeba všech reakčních činidel u této techniky.

5 Závěr

Stanovení prokainu spektrofotometricky pomocí technik FIA a SIA bylo úspěšně optimalizováno. Metoda je založena na reakci prokainu s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou za vzniku barevného produktu spektrofotometricky detekovatelného při jeho absorpčním maximu $\lambda_{\max} = 484 \text{ nm}$. Z výšek píků je odečítána hodnota absorbance, která je úměrná koncentraci.

Nejprve byly ověřovány parametry této reakce, jako je vlnová délka absorpčního maxima, vybarvování reakční směsi, vliv různé koncentrace organického rozpouštědla, vybarvovacího činidla, surfaktantu a vliv teploty.

Pro potvrzení platnosti reakce prokainu s kyselinou 1,2-naftochinon-4-sulfonovou tak, jak je uvedená v článku, z něhož tato práce vycházela, bylo změřeno hmotnostní spektrum prokainu, kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové a produktu jejich reakce. Měřením byl potvrzen vznik produktu v souladu s výše zmíněnou publikací.

S ohledem na získané informace byly optimalizovány parametry měření v uspořádání FIA, jako jsou doba zastavení toku (stop-flow), průtoková rychlost, koncentrace vybarvovacího činidla, objem dávkovací smyčky a pH. Následně byly optimalizovány parametry měření v uspořádání SIA, a to koncentrace vybarvovacího činidla, objemy reakčních zón, průtoková rychlost a časová závislost. Při takto stanovených optimálních parametrech byly změřeny kalibrační křivky a charakteristiky stanovení, pomocí kterých je možné obě metody porovnat.

Mez detekce prokainu pro metodu FIA je $0,72 \text{ } \mu\text{g/ml}$, mez stanovitelnosti je $2,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Pomocí SIA techniky je možné dosáhnout nižších hodnot pro mez detekce, $0,68 \text{ } \mu\text{g/ml}$, i pro mez stanovitelnosti, $2,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Na druhou stranu uspořádání FIA je citlivější – hodnota citlivosti je $5,9 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g/ml}$, kdežto pro uspořádání SIA je to $4,98 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g/ml}$. A také hodnoty pro opakovatelnost jsou nižší při uspořádání FIA (1,58 %) než při uspořádání SIA (2,74 %). Lineární dynamický rozsah je pro obě metody stejný, stejně tak je prakticky stejná i hodnota korelačního koeficientu.

Stanovení vychází z článku [1], kde je prokain hydrochlorid stanovován touto reakcí v klasickém statickém uspořádání spektrofotometrického měření, mez detekce je $0,28 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Cílem bylo převést tuto metodu do průtokového uspořádání při zachování stejně nízké meze detekce, čehož bylo v rámci řádů úspěšně dosaženo.

Dalším cílem bylo stanovit prokain ve farmaceutických přípravcích za účelem ověření deklarované koncentrace účinné látky. K dispozici byly dva injekční roztoky prokain hydrochloridu o koncentracích 0,2 % a 0,5 %. Naměřené hodnoty $0,21 \pm 0,04$ % ($s_r = 3,34$ %) a $0,54 \pm 0,02$ % ($s_r = 1,74$ %) pro FIA a $0,18 \pm 0,02$ % ($s_r = 2,52$ %) a $0,51 \pm 0,09$ % ($s_r = 4,07$ %) pro SIA svědčí o úspěšném stanovení analytu v obou vzorcích.

Literatura

- [1] L. X. Xu, Y. X. Shen, H. Y. Wang, J. G. Jiang, and Y. Xiao, "Spectrophotometric determination of procaine hydrochloride in pharmaceutical products using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as the chromogenic reagent," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. **59**, no. 13, pp. 3103–3110, (2003).
- [2] A. Wang, J. Fan, S. Feng, and F. Cui, "Spectral study and determination of metoclopramide and procaine hydrochloride by sequential injection analysis," *Spectrosc. Spectr. Anal.*, vol. **25**, no. 3, pp. 432–435, (2005).
- [3] V. Cerdà, J. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, and P. Sitjar, "Flow techniques in water analysis," *Talanta*, vol. **50**, no. 4, pp. 695–705, (1999).
- [4] H. Pasekova, M. Polasek, and P. Solich, "Sequential injection analysis," *Chem. List.*, vol. **93**, no. 6, pp. 354–359, (1999).
- [5] J. Ruzicka and E. H. Hansen, "Peer Reviewed: Flow Injection Analysis: From Beaker to Microfluidics.," *Anal. Chem.*, vol. **72**, no. 5, p. 212 A–217 A, (2000).
- [6] F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychlovský, a Z. Plzák, *Základní analytická chemie*, 1. vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003.
- [7] FIALab instruments: principy metod. Dostupné z URL: <http://www.flowinjection.com/tutorials/principles> (cit. 30. 4. 2015)
- [8] C. R. Wu and J. L. Liu, "HeMicro Sequential Injection Lab-On-Valve for Process Monitoring and Bioanalytical Assays," *Process Anal. Technol.*, vol. **3**, no. 3, pp. 25–30, (2006).
- [9] R. Pérez-Olmos, J. Soto, N. Zárate, A. Araújo, and M. Montenegro, "Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. **554**, no. 1–2, pp. 1–16, (2005).
- [10] R. Mesquita and A. Rangel, "A review on sequential injection methods for water analysis.," *Anal. Chim. Acta*, vol. **648**, no. 1, pp. 7–22, (2009).
- [11] M. Decuir, H. Boden, A. D. Carroll, and J. Ruzicka, "Principles of micro Sequential Injection Analysis in the Lab-on-Valve format and its Introduction into a Teaching Laboratory," *J. flow Inject. Anal.*, vol. **24**, pp. 103–108, (2007).

- [12] I. Němcová, L. Čermáková, a P. Rychlovský, *Spektrometrické analytické metody I*, Praha: Nakladatelství Karolinum, 1997.
- [13] D. Lincová a H. Farghali, *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání, Praha: Galén, 2007.
- [14] SÚKL, Sulutio thomas cum procaino. Dostupné z URL:
<<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0058233&tab=info>>
(cit. 30. 4. 2015)
- [15] V. Ščigel, *Lokální anestezie v praxi zubního lékaře*. Praha: Quintessenz bibliothek, 2004.
- [16] Bioveta, a. s. Veterinární a humánní přípravky. Dostupné z URL:
<<http://www.bioveta.cz/cs/veterinari-divize/pripravky/katalog-pripravku/procain-bioveta-100-mg-ml-injekcni-roztok.html>> (cit. 30. 4. 2015)
- [17] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009.
- [18] A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, and J. Watts, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, 4. ed. Pharmaceutical Press, 2011.
- [19] Drug bank. Dostupné z URL:
<<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00721>> (cit. 30. 4. 2015)
- [20] C. Y. Wang, X. Y. Hu, G. Di Jin, and Z. Z. Leng, "Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. **30**, no. 1, pp. 131–9, (2002).
- [21] W. Qin, Z. Jiao, M. Zhong, X. Shi, J. Zhang, Z. Li, and X. Cui, "Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. **878**, no. 15–16, pp. 1185–9, (2010).
- [22] F. Hampl, S. Rádl, a J. Paleček, *Farmakochemie*, Praha: VŠCHT, 2002.
- [23] SÚKL, Prokain. Dostupné z URL:
<[http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=&data\[code\]](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=&data[code])>

=&data[atc_group]=&data[material]=procain&data[path]=&data[reg]=&data[radio]=none&data[chbox][]=marketability&data[rc]=&data[chbox][]=braill-yes&data[chbox][]=braill-no&data[chbox][]=braill-def&data[with_adv]=0&search=Vyhledat&data[listing]=20> (cit. 30. 4. 2015)

- [24] European pharmacopoeia 5.0. Dostupné z URL:
<[http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_1-p/Procaine hydrochloride.pdf](http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_1-p/Procaine%20hydrochloride.pdf)> (cit. 30. 4. 2015)
- [25] International pharmacopoeia. Dostupné z URL:
<<http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>> (cit. 30. 4. 2015)
- [26] L. D. Liu, Y. Liu, H. Y. Wang, Y. Sun, L. Ma, and B. Tang, "Use of p-dimethylaminobenzaldehyde as a colored reagent for determination of procaine hydrochloride by spectrophotometry.," *Talanta*, vol. **52**, no. 6, pp. 991–9, (2000).
- [27] A. S. Amin and A. M. El-Didamony, "Colorimetric determination of benzocaine, lignocaine and procaine hydrochlorides in pure form and in pharmaceutical formulations using p-benzoquinone.," *Anal. Sci.*, vol. **19**, no. 10, pp. 1457–9, (2003).
- [28] Y. Chen, F. Tian, and M. Song, "Spectrophotometric determination of procaine hydrochloride with hemoglobin as catalyst," *J. Anal. Chem.*, vol. **64**, no. 4, pp. 366–370, (2009).
- [29] A. Segura Carretero, C. Cruces-Blanco, S. Fernández Peinado, R. El Bergmi, and A. Fernández Gutiérrez, "Fluorimetric determination of procaine in pharmaceutical preparations based on its reaction with fluorescamine.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. **21**, no. 5, pp. 969–74, (1999).
- [30] S. Shuang and M. M. Choi, "Retention behaviour and fluorimetric detection of procaine hydrochloride using carboxymethyl-beta-cyclodextrin as an additive in reversed-phase liquid chromatography.," *J. Chromatogr. A*, vol. **919**, no. 2, pp. 321–9, (2001).
- [31] Y. Sun, L. Ma, H. Wang, and B. Tang, "Determination of procaine hydrochloride by fluorimetry," *Spectrosc. Spectr. Anal.*, vol. **22**, no. 4, pp. 637–640, (2002).

- [32] H. Pasekova and M. Polasek, "Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection," *Talanta*, vol. **52**, no. 1, pp. 67–75, (2000).
- [33] N. Li, Y. Chi, J. Wang, J. Duan, and G. Chen, "Determination of procaine hydrochloride using flow injection inhibitory chemiluminescence," *Luminescence*, vol. **18**, no. 3, pp. 125–30, (2003).
- [34] K. Wu, H. Wang, F. Chen, and S. Hu, "Electrochemistry and voltammetry of procaine using a carbon nanotube film coated electrode," *Bioelectrochemistry*, vol. **68**, no. 2, pp. 144–9, (2006).
- [35] G. Dutu, M. Tertis, R. Sandulescu, and C. Cristea, "Differential Pulse and Square Wave Voltammetric Methods for Procaine Hydrochloride Determination using Graphite Based SPEs Modified with p," *Rev. Chim.*, vol. **65**, no. 2, pp. 142–147, (2014).
- [36] M. F. Bergamini, A. L. Santos, N. R. Stradiotto, and M. V. B. Zanoni, "Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. **43**, no. 1, pp. 315–9, (2007).
- [37] M. Culea, N. Palibroda, M. Chiriac, Z. Moldovan, and A. D. Abraham, "Isotope Dilution Mass Spectrometry for Procaine Determination in Biological Samples," vol. **20**, no. July, pp. 740–742, (1991).
- [38] T. Ohshima and T. Takayasu, "Simultaneous determination of local anesthetics including ester-type anesthetics in human plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. **726**, no. 1–2, pp. 185–194, (1999).
- [39] Y. T. He, J. D. Peng, J. X. Tang, and C. Zhang, "Incorporation of high performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering detection for determination of procaine and lidocaine in human plasma," *Anal. Methods*, vol. **5**, no. 24, p. 7110, (2013).
- [40] K. Eckschlager, *Chemometrie*. Praha: Karolinum, 1991.